UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ETIENE DE ANDRADE MUNHOZ

Avaliação radiográfica, biomecânica e microscópica de enxerto ósseo xenogênico associado a implantes de titânio em mandíbula de coelhos

BAURU
2009

ETIENE DE ANDRADE MUNHOZ

Avaliação radiográfica, biomecânica e microscópica de enxerto ósseo xenogênico associado a implantes de titânio em mandíbula de coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia
Orientador: Prof. Dr. Osny Ferreira Junior

BAURU
2009

Munhoz, Etiene de Andrade

M925a Avaliação radiográfica, biomecânica e microscópica de enxerto ósseo xenogênico associado a implantes de titânio em mandíbula de coelhos / Etiene de Andrade Munhoz. – Bauru, 2009.
146p.: il.; 30cm.

Tese. (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Osny Ferreira Junior

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de ética em animais da FOB-USP
Protocolo nº: 21/2005
Data:14/10/2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

ETIENE DE ANDRADE MUNHOZ

15 de setembro de 1980	Nascimento Bauru - SP
Filiação	Ademir da Jesus Cáceres Munhoz Marisa Alonso de Andrade Munhoz
1999 - 2002	Curso de Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.
2003 - 2005	Curso de Pós-graduação em Estomatologia, ao nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.
2005 - 2009	Curso de Pós-graduação em Estomatologia, ao nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que sempre esteve presente em minha vida, me iluminando. Por me permitir viver e realizar todos os meus sonhos!

Aos meus pais Ademir e Marisa, ao meu irmão Bruno, e aos meus avôs Maria, Israel, Clemência e Eduardo (in memorian), razão de tudo para mim!

Obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio, carinho e incentivo, por toda confiança e admiração quem têm por mim. Essa vitória é de vocês também!

Ao meu namorado, Augusto por todo o carinho, dedicação e amor por mim!!! Agradeço todos os momentos de compreensão nas dificuldades, pela ajuda e apoio que você sempre me deu. A cada dia mais tenho certeza de que nosso amor é firme e persistirá ao longo do tempo!

Você é a escada da minha subida
Você é o amor da minha vida
É o meu abrir de olhos no amanhecer
Verdade que me leva a viver

Você é a espera na janela
A ave que vem de longe tão bela
A esperança que arde em calor
Você é a tradução do que é o amor!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome de seu diretor, Professor Dr. Luiz Fernando Pergoraro e a todos os professores da casa que contribuíram com a minha formação.

Adentrar a esta Instituição há 10 anos foi a realização de um sonho e ter vivenciado o ensino, a ciência e formação humanística que ela proporciona me tornaram uma pessoa muito melhor! Tenho muito orgulho de ser USPiana!!!

Ao meu orientador, Professor Dr. Osny Ferreira Junior, que me acolheu no inicio do mestrado. Agradeço a valiosa e competente orientação desse trabalho. Também por sempre ter acreditado na minha capacidade, pela confiança, por todas as palavras de incentivo, de conforto nas dificuldades e principalmente pela amizade construída nesses anos!

Ao Professor Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho, por toda orientação científica, auxilio no fornecimento dos implantes, nos testes biomecânicos e pela convivência!

À bióloga e recém doutora Tânia Mary Cestari, que foi como orientadora também nesse trabalho, pois contribuiu ativamente em todas as fases! Sem ela não teria conseguido realizá-lo! Agradeço a toda sua disponibilidade, por ter deixado a convivência com a sua família varias vezes à noite ou nos finais de semana para ajudar a mim e a todos a sua volta. Com certeza ela terá um futuro muito brilhante como cientista!!!

Ao Professor Dr. Rumio Taga, pela orientação na elaboração do projeto e todos os ensinamentos durante a graduação e pós sobre histologia e biologia óssea!

Ao Professor Dr. José Mauro Granjeiro também pela colaboração no projeto e pelo auxilio no fornecimento do biomaterial.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, por toda orientação na realização da estatística deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Estomatologia, Radiologia e Cirurgia:

Ao Prof. Dr. José Humberto Damante, que despertou em mim a paixão pela docência ainda na graduação e por quem tenho uma grande admiração e carinho!!! Agradeço a todos os ensinamentos clínicos, científicos e humanísticos transmitidos, todas as palavras de incentivo e confiança em mim depositada esses anos!

À Profa. Dra. Ana Lucia Álvares Capelozza, uma pessoa de um carisma contagiante!!! Muito obrigada por todas as conversas, conselhos, pela torcida e pelos ensinamentos!!!

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato, muito obrigada pelos ensinamentos clínicos e pela convivência!

À Profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, dotada de grande inteligência e simplicidade, muito obrigada pelos ensinamentos de radiologia digital, tomografia, científicos e obrigada pela amizade e consideração!!!

Ao Prof. Dr. Eduardo Sant'Ana, por todos os ensinamentos clínicos em Cirurgia e pela convivência.

Aos funcionários do departamento: Marilia Gião, Luciana Zanon Fontes Lozano, Roberto Ponce Salles, Fernanda Aparecida Daniel Cavalari, Elza Maria Cassalate, Josieli Aparecida Tripodi Farinha, Alexandre Simões Garcia pela disponibilidade e presteza.

Aos meus amigos da Estomatologia Carla Ruffeil Moreira, Letícia Rodrigues Nery, Camila Lopes Cardoso, Marta da Cunha Lima, Ana Cláudia de Araújo Pires, Moacyr Tadeu Vicente Rodrigues, Marcelo Junior Zanda, Gustavo de Almeida Lautenschlager, Josiane Costa Rodrigues de Sá, Melissa Rodrigues de Araujo, Renata Cordeiro Teixeira, Elen de Souza Tolentino, Gabriel Fioreli Bernini, Christiano de Oliveira Santos, Daniele Frota Albuquerque, Manuela Rodriguez, Renato Yassutaka Faria Yaedu e Fernando Toledo de Oliveira.

Agradeço por toda convivência, as palavras, os desabafos, as brincadeiras e a amizade.

A turma de pós da Estomatologia sempre foi muito unida e aqui fiz grandes amigos que vou levar pra vida toda!!! Espero que nossa amizade continue apesar dos caminhos que cada um tomou ou tomará!!!

Também gostaria citar os nomes e de fazer um agradecimento especial aos amigos e colegas já citados acima que me ajudaram nas inúmeras cirurgias dos animais: Tadeu, Camila, Letícia, Gustavo, Renata, Josiane, Gabriel e Manuela.

À Capes, pela bolsa de estudos a mim concedida.

À FAPESP pelo auxílio financeiro a essa pesquisa.

À Conexão Implantes pela doação dos implantes e auxilio nos testes biomecânicos. Ao engenheiro Carlos Nelson Elias e aos funcionários pela gentileza em me receber para os testes na empresa.

A Baumer SA pela doação dos biomateriais utilizados no trabalho.

Aos funcionários do Biotério: Luiz Carlos da Silva, Elias Francisco Cresta, Erasmo Gonçalves da Silva e Richard Nelson G. Simões, por todo auxilio durante o experimento por lá realizado. Pelos auxílios no manejo, nos cuidados com limpeza e alimentação dos animais, pelas ajudas nos dias das cirurgias e medicação.

A veterinária Silvia Helena Pereira Sgarbosa, por toda ajuda no manejo dos animais, nas necropsias para detectar a causa da morte no inicio do trabalho, pelas ajudas com medicações e eutanásia.

Aos funcionários do CIP, Marcelo Milanda Ribeiro Lopes, D. Neusa Caetano Barbosa pela convivência e em especial a Márcia Sirlene Zardin Graeff por toda torcida, exemplo de perseverança e de força diária e todo auxílio na análise dos espécimes no microscópio confocal.

Aos funcionários do setor de compras e em especial ao Sergio Fumio Yoneyama do Setor de patrimônio pelos auxílios nos consecutivos reparos que os equipamentos Exakt necessitaram.

Aos funcionários do Departamento de Histologia Daniele Santi Ceolin e Patrícia de Sá Mortagua Germino por toda ajuda no preparo, corte e coloração dos espécimes e pela convivência.

Aos meus sogros, Beatriz e Edgar e minha cunhada, Rafaela, pelo apoio, incentivo e momentos agradáveis que sempre tivemos.

Aos amigos Fernanda Lourenção Brighenti, José Gustavo Ribeiro Rodrigues, Josiane de Carvalho Simas, Camila Campos Padovese, Angélica dos Reis Hannas, pela amizade verdadeira ao longo desses anos, alguns de muito tempo!!! Com certeza o convívio com vocês me fez sentir mais forte para seguir em frente, me renovando e me deixando alegre a cada encontro!

E enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho,

os meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

O propósito deste trabalho foi avaliar a interação de matriz óssea bovina inorgânica, (Gen-ox®) como material de enxerto e implantes de titânio em mandíbula de coelhos. A amostra constituiu-se de 32 coelhos da raça Botucatu de aproximadamente 4kg. Os incisivos inferiores destes animais foram extraídos e foi realizada um defeito de aproximadamente 4mm de diâmetro. Um dos lados foi mantido apenas com coágulo (grupo controle) e o outro lado (grupo experimental) recebeu o enxerto do material proposto. Após 60 dias foram instalados implantes bilateralmente na região do defeito. Os animais foram eutanaziados imediatamente após a instalação dos implantes e após 1, 2 e 6 meses (n=6) para o grupo microscópico a após 2 e 6 meses para o grupo do teste biomecânico (n=4). A análise constituiu de medidas da distância da crista óssea alveolar à plataforma do implante, da densidade radiográfica em valores de pixel ma região do alvéolo, de teste biomecânico de torque de remoção e microscópico através de medidas de contato osso-implante (BIC) (em µm e %) e área de osso (em μm^2 e %). Os resultados demonstraram que não houve diferenças significantes nem durante o tempo e nem entre os grupos na analise de distancia entre crista óssea alveolar e plataforma do implante. Na medida de densidade óssea, não houve variação significante ao longo do tempo, mas houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, sendo maior no grupo experimental. Para o teste biomecânico também não houve variação significante do torque de remoção ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos. Na análise de contato osso implante (BIC) não houve variação significante ao longo do tempo, mas houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, sendo maior no grupo experimental e houve interação entre tempos e grupos. E com relação a medida de área de osso não houve diferenças significantes nem durante o tempo e nem entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados. Os resultados sugerem que o material foi bem aceito na região e teve comportamento semelhante ao coágulo em contato com a superfície do implante.

Palavras chave: Enxerto xenogênico. Implantes de titânio. Microscópio confocal.

ABSTRACT

Radiographic, biomechanical and microscopic evaluation of xenogenic bone graft associated to titanium implants in rabbits mandible

The aim of this study was to evaluate the interaction of an inorganic bovine bone matrix (Gen-ox®) as bone graft and titanium implants in rabbit's mandible. Thirty-two Botucatu rabbits weighting about 4kg were used on this experiment. The mandible incisives were extracted and a defect of 4 mm of diameter was performed. One socket and defect was filled with experimental material. The opposite site was left to heal naturally and served as control. After 60 days, the implants were installed on the defect region. The animals were killed immediately after the implant installation and after 1, 2 and 6 months. Vertical bone height, bone density, biomechanical test, bone implant contact (BIC) and bone area near to implant threads were evaluated. The results showed that there was no significant differences on the distance between the alveolar bone crest to the implant platform (vertical bone height) along the time, neither between groups. On the bone density (pixel value) there was no significant difference along the time, but there was significant difference between groups, being the experimental group higher. For the biomechanical test there was no significant difference along the time, neither between groups. There was no significant differences on the bone implant contact (BIC) measures along the time, but there was significant difference between groups, being the experimental groups higher and there was interaction between time and groups. On bone area evaluation, there was no significant difference along the time, neither between the groups during the analyzed time. The graft behavior observed by the authors was similar to that of the control group, suggesting high acceptance of the material as graft option associated to titanium implants.

Keywords: Xenogenic graft. Titanium implants. Confocal microscope.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27

2 REVISÃO DE LITERATURA 31
2.1 REPARO ALVEOLAR E O USO DE BIOMATERIAIS 33
2.2 O USO DE BIOMATERIAIS E IMPLANTES DE TITÂNIO 38
2.3 A ANÁLISE DA OSTEOINTEGRAÇÃO 40

3 PROPOSIÇÃO 47

4 MATERIAL E MÉTODOS 51
4.1 AMOSTRA 53
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE EXTRAÇÃO E APLICAÇÃO DE MATERIAL DE ENXERTO 53
4.3 INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES 57
4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS PEÇAS 59
4.5 ANÁLISE BIOMECÂNICA 60
4.6 HISTOMORFOMETRIA DA REGIÃO APÓS TESTE BIOMECÂNICO 62
4.7 ANÁLISE RADIOGRÁFICA 64
4.8 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO – SISTEMA EXAKT 66
4.9 CORTES E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS 69
4.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS DO SISTEMA EXAKT 71
4.11 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COM MICROSCÓPIO CONFOCAL 73

5 RESULTADOS 77
5.1 ANÁLISE BIOMECÂMICA (TORQUE DE REMOÇÃO) 79
5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA CONVENCIONAL DOS ANIMAIS DO GRUPO TORQUE 80
5.2.1 Contato osso-implante (BIC) 80
5.2.2 Contato osso-implante percentual (BIC em %) 80
5.2.3 Área de osso em μm^2 81
5.2.4 Área de osso percentual 82

5.3 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS 83
5.3.1 Período de 2 meses 83
5.3.2 Período de 6 meses 84
5.4 ANÁLISE RADIOGRÁFICA 85
5.4.1 Medida linear entre a crista óssea alveolar e a plataforma do implante (mm) 85
5.4.2 Densidade óssea (valores de pixel) 86
5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA NO SISTEMA EXAKT 87
5.5.1 Medida de contato osso-implante (BIC) 88
5.5.2 Contato osso-implante percentual (BIC %) 90
5.5.3 Área de osso em μm^2 92
5.5.4 Área de osso em % 93
5.6 DESCRIÇÃO DOS PERÍODOS E GRUPOS 94
5.6.1 Período de 0 Hora 94
5.6.2 Período de 1 mês 95
5.6.3 Período de 2 meses 96
5.6.4 Período de 6 meses 97
5.7 ANÁLISE DAS IMAGENS DO MICROSCÓPIO CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA 99
5.7.1 Marcador tetraciclina 99
5.7.1.1 Área de marcação em $pixel^2$ 99
5.7.1.2 Área de marcação em % 103
5.7.2 Marcador alizarina 104
5.7.2.1 Área de marcação em $pixel^2$ 104
5.7.2.2 Área de marcação em % 106
5.7.3 Marcador calceína 107
5.7.3.1 Área de marcação em $pixel^2$ 107
5.7.3.2 Área de marcação em % 109
5.7.4 Descrição dos períodos e grupos 110
5.7.4.1 Período de 0 Hora 110
5.7.4.2 Período de 1 Mês 111
5.7.4.3 Período de 2 Meses 112
5.7.4.4 Período de 6 Meses 115

6 DISCUSSÃO 117
6.1 SOBRE A METODOLOGIA APLICADA 119
6.1.1 Sobre o modelo experimental utilizado 119
6.1.2 Sobre os métodos de avaliação empregados 120
6.2 SOBRE OS RESULTADOS OBTIDOS 122
6.2.1 Análise biomecânica 122
6.2.2 Análise radiográfica 123
6.2.3 Análise de contato osso implante (BIC) 124
6.2.3.1 Grupo desmineralizados após teste de torque 124
6.2.3.2 Grupo do sistema Exakt 124
6.2.4 Análise de área de osso no sistema Exakt 128
6.2.5 Análise da microscopia confocal 129

7 CONCLUSÃO 133

REFERÊNCIAS 137

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Entre os problemas de difícil solução, na Medicina e Odontologia, incluem-se os defeitos ósseos de grandes dimensões que, deixadas ao seu livre curso levariam mais tempo para reparar-se (CALIXTO et al., 2001).

A extração dentes pode ser indicada por diversos motivos. Após a exodontia ocorre um processo de reabsorção do osso alveolar, causando deficiência de altura e espessura óssea. Isto pode se tornar um problema clínico, pois: 1- cria problemas estéticos para confecção de próteses convencionais ou sobre implantes; 2- pode dificultar ou impossibilitar a colocação de implantes se o nível ósseo não for mantido e 3- também prejudicar a estabilidade de próteses totais (CAMARGO et al., 2000).

Em situações dessa natureza, quando há previsão de reabsorção alveolar, pode-se fazer uso de biomateriais para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos. Com o objetivo de solucionar esses problemas, têm se intensificado as pesquisas para o desenvolvimento de materiais que apresentem características adequadas de biocompatibilidade e osteointegração.

O requisito mínimo para a implantação de materiais em tecidos vivos é a biocompatibilidade. No caso dos implantes intra-ósseos, espera-se que o material implantado seja capaz de estabelecer um contato direto com o tecido ósseo reparacional (osteointegração direta). Os biomateriais podem também estabelecer com o osso circundante uma integração direta fibro-óssea, quando uma cápsula fibrosa se interpõe entre eles e a superfície do osso, o que é aceitável apenas nos estágios iniciais pós-implantação por ser desfavorável à estabilidade dos implantes em longo prazo (CALIXTO et al., 2001).

Têm-se utilizado com sucesso enxertos de osso bovino liofilizado inorgânico ou produtos nacionais similares, como o Gen-Ox ®inorgânico (GENIUS). A despeito dos componentes já terem sido testados isoladamente seu efeito associado a implantes foi muito pouco avaliado em estudos científicos para avaliar se seu uso para fins de reabilitação com implantes promove uma eficaz osteointegração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPARO ALVEOLAR E O USO DE BIOMATERIAIS

Segundo Gregori, em 1996, a capacidade de reparação das lesões causadas por traumatismos em suas estruturas orgânicas é inerente ao ser vivo. É devido a essa capacidade de reparação que podemos fazer uso da terapêutica cirúrgica. Esse fato justifica a importância de buscar novas informações que acompanhem a reparação tecidual, um fator com intensa participação nos mecanismos de defesa e da própria vida do organismo.

Shafer, Hine e Levy , em 1985, observaram que depois da remoção do dente, o sangue que preenche o alvéolo coagula. Há vasodilatação e ingurgitação dos vasos sanguíneos nos restos do ligamento periodontal e mobilização de leucócitos na área à volta do coágulo. Na primeira semana após a extração, é evidente a proliferação de fibroblastos provenientes das células do tecido conjuntivo dos restos do ligamento periodontal. Esses fibroblastos começam a crescer para dentro e à volta do coágulo.

Durante a segunda semana o coágulo sanguíneo torna-se organizado pela invasão de fibroblastos que crescem sobre a rede de fibrina. Nesta fase, novos capilares penetram no centro do coágulo, e os restos do ligamento periodontal sofrem degeneração gradual e não são mais reconhecíveis; as paredes do alvéolo aparecem, agora, ligeiramente irregulares e, em alguns casos, podem ser observadas trabéculas de tecido osteóide projetando-se da parede do alvéolo (SHAFER, HINE e LEVY, 1985).

Na terceira semana, o coágulo primitivo apresenta-se quase que completamente organizado pelo tecido de granulação em maturação. Em toda a periferia da ferida, a partir da parede do alvéolo, formam-se trabéculas muito jovens de osteóide ou osso não-mineralizado. Este osso é formado por osteoblastos derivados de células pluripotentes do ligamento periodontal que adquirem função osteogênica (SHAFER, HINE e LEVY, 1985).

Na quarta semana após a extração, inicia-se o estágio final da cicatrização da ferida, no qual há deposição contínua e reabsorção moderada do osso que preenche o alvéolo; essa remodelação continuará por mais várias semanas (SHAFER, HINE e LEVY,1985).

Entre os problemas de difícil solução, na Medicina e Odontologia, incluem-se os defeitos ósseos de grandes dimensões que, deixadas ao seu livre curso levariam mais tempo para reparar-se (CALIXTO et al., 2001).

Há ainda o problema de reabsorção óssea após a exodontia, causando uma deficiência de altura e espessura óssea, que é um problema clínico em dois aspectos, pois cria problemas estéticos para confecção de próteses convencionais ou sobre implantes e pode dificultar ou impossibilitar a colocação de implantes se o nível ósseo não for mantido e também dificultar a estabilidade de próteses totais (CAMARGO et al., 2000).

Em situações dessa natureza pode-se fazer uso de biomateriais para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos. Tendo isso em vista, têm se intensificado as pesquisas para o desenvolvimento de materiais que apresentem características adequadas de biocompatibilidade e osteointegração (TAGA, 1996; MASTERS, 1988; CALIXTO et al., 2001).

O requisito mínimo para a implantação de materiais em tecidos vivos é a biocompatibilidade. Qualquer material estranho colocado no interior de tecidos vivos provoca uma resposta, e não é a resposta em si, mas sua extensão, intensidade e duração que determinam a biocompatibilidade, ou seja, um estado de mútua coexistência entre um material e o ambiente fisiológico, sem que um exerça efeito desconfortável sobre o outro (CALIXTO et al., 2001).

No caso dos implantes intra-ósseos, espera-se que o material implantado seja capaz de estabelecer um contato direto com o tecido ósseo reparacional (osteointegração direta). Os biomateriais podem também estabelecer com o osso circundante uma integração direta fibro-óssea, quando uma cápsula fibrosa se interpõe entre eles e a superfície do osso, o que é aceitável apenas nos estágios iniciais pós-implantação por ser desfavorável à estabilidade dos enxertos em longo prazo (CALIXTO et al., 2001).

Os biomateriais são classificados em osteoindutores e osteocondutores.

Os osteoindutores são aqueles que quando colocados em uma ferida óssea auxiliam a reparação da mesma, induzindo a formação de novo tecido ósseo por um mecanismo no qual células mesenquimais indiferenciadas são diferenciadas em osteoblastos (TAGA, 1996).

Os osteocondutores são aqueles que, quando colocados em uma ferida óssea, preenchem a cavidade óssea guiando o tecido ósseo na sua neoformação. O material osteocondutor pode ser englobado pelo tecido ósseo neoformado passando a fazer parte do novo tecido (TAGA, 1996).

A diferença fundamental entre ambos é que um é biologicamente ativo e outro serve apenas como material de preenchimento (TAGA, 1996).

Dentre os materiais osteoindutores, pode-se destacar:

Osso autógeno: sem dúvida é o material padrão ouro de enxerto devido ao fato de inexistir a possibilidade de rejeição, pois o material é obtido do tecido ósseo do próprio indivíduo. Além da osteoindução, ele tem propriedades osteoindutoras e osteogenéticas. Ele pode ser obtido através de alvéolo cirúrgico provocado ou através da retirada de fragmentos de osso de regiões distantes como túber da maxila, osso mentoniano, região retromolar, crista ilíaca e calota craniana. O fator limitante é a necessidade de cirurgias traumáticas e a quantidade limitada de material disponível (TAGA, 1996).

Osso alógeno: é comercializada nos Estados Unidos e conhecida mundialmente pela sigla FDBA (freeze-dried bone allografts – osso alógeno liofilizado) e o desmineralizado DFDBA (desmineralized freeze-dried bone allografts - osso alógeno liofilizado desmineralizado), que significa osso desmineralizado e liofilizado. O processo de trituração do osso para sua desmineralização permite a obtenção de pó de osso com diferentes granulometrias. É indicada para todas as situações de perda óssea. No Brasil é proibida a comercialização de material de procedência humana. Além disso, o custo para manutenção do banco de ossos é muito elevado, há pouca disponibilidade e há riscos de contaminação por diversas doenças (TAGA, 1996).

Matriz orgânica de osso bovino: desprovida de células, lipídios e proteínas imunogênicas e constituída basicamente de colágeno tipo I. É obtida a partir de osso cortical bovino totalmente livre de osso medular. Do ponto de vista imunológico, ele

não induz o aperfeiçoamento de células linfocitárias no teste de biocompatibilidade, além disso, é totalmente reabsorvido após 90 dias e tem ação osteoindutora devido a presença de proteínas e colágeno. As vantagens deste tipo de material é que vem de uma fonte praticamente inesgotável e com custo relativamente barato (TAGA, 1996).

Taga et al., em 1997, avaliaram o reparo de defeito ósseo critico em crânios de cobaias com aplicação de Osseobond® comparado a apenas coágulo e encontram, no grupo controle, todos os defeitos preenchidos apenas por tecido fibroso quase que em toda lesão após seis meses. Já no grupo experimental havia intenso processo de reparação óssea após seis meses, estando a maioria preenchidos quase que completamente por tecido ósseo organizado. A partir de resultados obtidos na pesquisa, a matriz liofilizada bovina teve capacidade de estimular a formação de novo tecido ósseo em sítio ortotópico de cobaias, reforçando as possibilidades de uso na clínica Odontológica. Garcia e Barbosa, em 2000, em um estudo de enxerto com Osseobond® em calvárias de coelhos encontraram também um resultado microscópico satisfatório, havendo melhora no reparo ósseo.

Fatores de crescimento ósseo (BMP) ou proteínas morfogenéticas do osso: são proteínas encontradas em grande quantidade no osso em desenvolvimento e que ficam enclausuradas na matriz orgânica do osso após a completa maturação do mesmo, ligadas ao colágeno. Foram descobertas por Urist em 1965 e desde então mais de 15 já foram relacionadas à capacidade de induzir a formação óssea ectópica. Ela é capaz de induzir a síntese de matriz óssea através de quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular de células mesequimais indiferenciadas em osteoblastos, tanto em regiões ortópicas e ectópicas, por ser um fator de crescimento (TAGA, 1996; TAGA, CESTARI e TAGA, 2000; LINDSEY, 2001). Os membros da família TGF-β, como a BMP, podem ser encontrados em muitos órgãos, mas estão armazenados, principalmente na matriz óssea e suas funções no reparo ósseo já foram comprovadas (LINDSEY, 2001). Uma característica destas proteínas morfogenéticas é que elas necessitam de um veículo para sua liberação, que pode ser colágeno, fibrina do coágulo, sulfato de cálcio, matriz orgânica de osso, hidroxiapatita, ácido poliático ou poliglicólico.

Taga, Cestari e Taga, em 2000, em estudo de caso clinico com preenchimento de alvéolo com mistura homogênea entre o “pool” de BMP bovina associada a hidroxiapatita absorvível (B.M.P.® - Dentoflex) e matriz orgânica de osso bovino liofilizado (Osseobond® - Dentoflex), coberto por membrana absorvível de cortical óssea bovina liofilizada (Bioplate® - Dentoflex) observou resultados satisfatórios, havendo microscopicamente aceleração do processo de reparo, otimizando-o tanto quantitativa quanto qualitativamente.

Dentre os materiais osteocondutores, pode-se destacar:

Matriz óssea inorgânica: é completamente desprovida de proteínas e células, constituída de hidroxiapatita natural com carbonato e tem a vantagem de ser facilmente estocada por longo tempo e possui propriedades biológicas satisfatórias. Este material age como arcabouço para formação óssea e tem propriedades osteocondutivas. Pode ser encontrada sob apresentação comercial como Bio-Oss® (Osteohealth Co) ou Gen-Ox® - Osso Bovino Inorgânico Liofilizado (Baumer S.A).

Segundo Zitzmann et al., em 2001, o uso de Bio-Oss® em alvéolos humanos revelou propriedades osteocondutivas, sendo positivo o seu uso.

Em outro trabalho em 2002, Indovina Jr e Michael, comparando Bio-Oss® com dois tipos de sulfato de cálcio e alvéolo com coagulo, encontrou após dois meses resultados semelhantes entre o coagulo e o Bio-Oss®, e não houve reabsorção dos outros materiais.

Artzi, Tal e Dayan, em 2000 e 2001 pesquisaram o comportamento histomorfométrico e histoquímico do Bio-Oss® em alvéolos humanos e observaram um consistente padrão de neoformação óssea, reabsorção de parte do material, havendo uma intensa interação do material com o tecido, considerando-o biocompatível, biodegradável e osteocondutor.

Carmagnola, Adriaens e Berglundh, em 2003 compararam microscopicamente alvéolos humanos preenchidos apenas por coágulo após 1 a 15 anos, utilizando membrana Bio-Gide® após 4 meses e com aplicação de Bio-Oss® e Bio-Gide® após 7 meses e encontraram os seguintes resultados: nos grupos sem enxerto ósseo havia osso mineralizado e medular nos dois grupos, sendo que no de 1 a 15 anos havia grande quantidade de osso cortical e no de 4 meses maior

presença de osso lamelar e medular. Já no grupo com Bio-Oss® havia após 7 meses presença de partículas, que eram circundadas por pequenas quantidades de osso cortical e tecido conjuntivo. Havia aproximadamente 26% de osso lamelar, 8,4% de osso cortical, 26,2% de medular e 18,1% de partículas de Bio-Oss®, sendo que 40% dessas partículas estavam em contato com tecido ósseo neoformado.

Dentro dessa categoria de osteocondutores encontram-se também os materiais aloplásticos como sulfato de cálcio, biocerâmicas (óxido de alumínio, de titânio, fosfato bete-tricálcico e vidro bioativo, polímeros (de mamona, acido polilático, poliglicólico), hidroxiapatita sintética, cimento de ionômero de vidro, além das membranas biológicas e aglutinantes que não entrarão nessa revisão.

2.2 O USO DE BIOMATERIAIS E IMPLANTES DE TITÂNIO

As vantagens do uso de biomateriais xenogênicos incluem a livre disponibilidade de quantidade, a eliminação de outro sítio cirúrgico, anestesia, tempo cirúrgico reduzido, menor perda de sangue e menos complicações, sendo uma fonte abundante e altamente segura, já que o processo de tratamento pelos quais passam (liofilização, desmineralização e desproteinização) elimina qualquer risco de antigenicidade ou zoonoses.

Graças às propriedades desses materiais, foi criado o Gen-ox® inorgânico (Mogi Mirim, Brasil, RMS: 103.455.00001), que foi utilizado no presente estudo.

Têm-se utilizado com sucesso enxertos de osso bovino liofilizado inorgânico, internacionalmente comercializado como Bio-Oss® (AABOE et al. 2000; CARMAGNOLA, ADRIAENS e BERGLUNDH, 2003; ZAFFE et al., 2003; HATANO, SHIMIZU e OOYA, 2004). Há também a associação destes materiais com BMP e matriz óssea orgânica (Gen-tech®, Baumer).

Há também muitos trabalhos que avaliam osteointegração de implantes (CORDIOLI et al., 2003; YOSHIMOTO et al., 2004), mas despeito dos componentes individuais desses produtos já terem sido testados isoladamente em diversos sitos, seu efeito foi pouco avaliado em estudos científicos quando de sua associação a

implantes em alvéolos dentários, tendo poucos trabalhos como referencia para comparação (THERHEYDEN et al., 1999, SCHWARZ et al., 2007, YOU et al., 2007).

A mandíbula de coelhos tem servido como modelo experimental para avaliação de reparo alveolar (CAO et al., 2001), materiais de enxerto (CORDIOLI et al., 2003, LILJENSNTSTEN et al., 1998; SAWAI et al., 1998; KUDO et al., 2001; LU e RABIE, 2003; FISCHER et al., 2004) e para avaliação de osteointegração de implantes (CORDIOLI et al., 2003; LILJENSNTSTEN et al., 1998; SAWAI et al., 1998; MOHAMMADI et al., 2000).

Há avaliações de enxerto autógeno em bloco em mandíbulas de coelho com fixação através de implantes de titânio (CORDIOLI et al., 2003; SAWAI et al.,1998). Liljensntsten et al., em 1998, avaliaram enxerto autólogo em associação a implantes de titânio em tíbia de coelhos.

Sawai et al., em 1998, também avaliaram enxertos autógenos em bloco retirados de crista ilíaca e fixados com implantes de titânio na base da mandíbula e o uso de câmara hiperbárica, mostrando resultados positivos em ambos os grupos (com ou sem o uso da câmara).

Zaffe et al., em 2003 avaliou enxertos ósseos de Bio-Oss® e implantes de titânio em tíbias de coelhos através de microradiografias e teste de resistência a movimentos de intrusão. Nas analises microscópicas foi observado osso neoformado envolvendo as partículas do enxerto e envolvendo a superfície de contato do implante na sua maioria havia osso medular com grande quantidade de vasos sanguíneos após 120 dias. O teste de resistência a intrusão mostrou que houve uma alta resistência do material e comportamento semelhante quanto ao tecido osteóide.

Além disso, outros animais também já serviram de modelo experimental nos poucos trabalhos avaliando associação de biomateriais e implantes.

Schwarz et al., 2007, comparou hidroxiapatita bifásica associada a beta fosfato tricalcico (Bone ceramic) e osso inorgânico liofilizado (BioOss) nas suas interações com implantes em cães e ambos materiais apresentaram um redução significativa no defeito residual, e aumentaram o contato com a superfície do implante após 9 meses. O remanescente de materiais em ambos os grupos

encontravam-se integrados a osso neoformado, mostrando boas propriedades osteocondutoras.

Em metodologia semelhante ao trabalho que será apresentado, You et al. em 2007 criaram defeitos em tíbias de cães e preencheram com BioOss apenas e associado a PRP e utilizaram implantes de titânio na área do defeito, mostrando bons resultados de osteointegração, apresentando uma media de 60% de contato osso-implante (BIC) no grupo com apenas o Bio-Oss, e em média 30% do associado com PRP.

Também Therheyden et al., em 1999, utilizando como modelo experimental os mini-pigs, associou utilização de Bio-Oss associado ou não a BMP para levantamento de seio maxilar e implantes através de avaliações tomográficas, e de microscopias confocal e convencional. Após 6 meses notou neoformação óssea em ambos os lados, mas a porcentagem de contato osso-implante (BIC) foi significantemente maior no lado experimental, ou seja, com associação de BMP (80%) do que no controle apenas com Bio-Oss (36%).

2.3 A ANÁLISE DA OSTEOINTEGRAÇÃO

A osteointegração foi relatada como sendo contato direto de osso e implante ou alternativamente a presença de interposição de pequena quantidade de tecido conjuntivo e osso de 95 a 200 nm de espessura (HANSSON, ALBERKTSSON e BRANEMARK, 1983). Essas observações foram feitas através de microscopia ótica, radiografia ou microscopia eletrônica de varredura.

Diversos autores estabeleceram parâmetros para análise da osteointegração dos implantes e dentre eles estão o radiográfico, o biomecânico e microscópico.

Os parâmetros de analise radiográfica para avaliação da osteointegração dos implantes mais utilizados são os de distancia entre implantes, no caso de implantes múltiplos, altura da crista óssea em relação à plataforma do implante e densidade óssea (HATLEY et al., 2001; BLANES et al., 2007; KIM et al., 2008).

Quando da avaliação radiográfica são proposto como critérios de sucesso do implante: ausência de área radiolúcida continua ao redor do implante (BUSER, WEBER e LANG 1990; ONG et al., 2008) e perda anual da altura óssea ao redor do implante não maior que valores entre 0,9 e 1,6 durante o primeiro ano e de 0,2mm nos anos seguintes pós-implantação (BRAGGER 1994; ONG et al., 2008; ALBREKTSSON et al., 1986; ALBREKTSSON e ISIDOR, 1994).

As analises de altura de crista óssea já são consagradas na periodontia como método para avaliar a condição periodontal ao redor de dentes e também pode ser aplicado na avaliação de osteointegração de implantes de titânio (SUNITHA et al., 2008; BLANES et al., 2007; HATLEY et al., 2001; BRAGGER 1994; NORTON e WILSON, 2002)

Já a densidade que é medida em valores de pixel digitalmente permite a avaliação da qualidade e da quantidade de deposição de osso ao redor ao longo dos períodos analisado (BRAGGER 1994, HATLEY et al., 2001).

Hatley et al., em 2001 utilizou esses parâmetros para análise em implantes instalados em tíbias de coelhos a diferentes distancias entre si e mostrou que mesmo implantes instalados com muita proximidade (1mm) mantiveram a mesma altura óssea e densidade comparado aos instalados com uma distancia maior.

Sobre o uso de testes biomecânicos ou torque de remoção pode-se inferir que a resistência encontrada para a remoção de um implante está relacionada ao grau de contato entre o osso e as irregularidades da superfície do implante (SENNERBY et al., 1992; CARLSSOM et al., 1988; BUCHTER et al., 2006). Portanto o torque de remoção de um implante é influenciado pelas propriedades mecânicas do osso adjacente (qualidade e quantidade) e também pelo índice de contato entre osso e implante (SENNERBY et al., 1992; IVANOFF et al., 1996; SAKAKURA et al., 2003; BRANEMARK e SKALAK, 1998; LOURENÇO JUNIOR, 1998; JOHANSSON e ALBREKTSON, 1987).

Em 1987, Johansson e Albrektson publicaram um estudo no qual procuraram avaliar o torque necessário para remoção de implantes em animais em diferentes intervalos de tempo pós-inserção. Relacionaram-se os valores obtidos para torque com o grau de contato osso-implante por meio de análise morfológica. Um total de 25 coelhos foram divididos em 5 grupos a serem sacrificados 3 semanas, 1, 3, 6 e

12 meses após inserção de implantes. Foram inseridos 50 implantes (2 por coelho) em suas tíbias. Em cada intervalo o grupo de animais tinha um dos implantes removidos utilizando-se torquimetro e o outro analisado microscopicamente. Os torques necessários para a remoção dos implantes após 3 semanas, 1, 3, 6 e 12 meses foram de 10, 16.8, 68, 77.6, e 88 Ncm respectivamente. Na avaliação morfológica observou-se aumento gradual do osso em contato direto com o implante de acordo com o aumento do intervalo de tempo pós-inserção.

Num trabalho utilizando-se como modelo experimental tíbia de coelhos, Sakakura et al., 2003 compararam através de testes biomecânicos e analise histológica a influencia da administração de ciclosporina na osteointegração de implantes mostrando diferenças significantes tanto no teste biomecânico sendo menores valores no grupo com uso da ciclosporina (39,2Ncm com no grupo controle e 28,5 Ncm no grupo cicliosporina após 12 meses). A analise microscópica confirmou essa diferença no teste biomecânico, apresentado também diferenças significantes.

Outro fato de análise muito importante é a microscópica, onde se pode observar a osteointegração em si, que conforme já citado seria a interação direta do osso com a superfície do implante.

Um dos critérios mais utilizados para essa análise é proporção de osso em contato direto com o implante, conhecido pela sigla BIC (em inglês *bone implant contact*) que é dada pela porcentagem de osso encontrado diretamente sobre o implante comparada a superfície total analisada, geralmente dado por medidas realizadas nas 3 a 5 roscas mais apicais, bilateralmente (BUCHTER et al., 2006, BRANEMARK et al., 1997; BRANEMARK et al., 1998, JUNG, YILDISHAN e WEHRBEIN, 2008; DE MAEZTU et al., 2008; RAHMANI et al., 2005; LOURENÇO, 1998; THERHEYDEN et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007; YOU et al., 2007).

Outra análise é proporção da área de osso presente na região próxima às roscas, também chamada de volume ósseo percentual, que é dada em porcentagem com relação à área total analisada (BRANEMARK et al., 1997; BRANEMARK et al., 1998; LOURENÇO, 1998; THERHEYDEN et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007). Essa análise pode ser considerada como morfométrica porque é capaz de quantificar a quantidade de osso formado, fato que maior interesse na osteointegração.

Sawai et al., em 1998 estudou o uso de câmera hiperbárica em enxertos autógenos e implantes em coelhos após 20, 30, 60, 90 e 120 dias através dos métodos de análise microscópicas citados acima e observou no grupo controle um valor de BIC de 3,7,10,15 e 27% e de 3, 17, 18, 23 e 38% no grupo com câmera hiperbárica, nos períodos citados acima. Já na analise de volume observou-se no grupo controle uma área de osso de 23, 33, 52, 60 e 68% e de 31, 48, 66, 67 e 72% no grupo experimental, também nos períodos citados acima.

Cordioli et al., em 2003 utilizou esses métodos de análise (BIC e volume ósseo) para analisar transplante de osso com implante. Os animais foram divididos em 2 grupos (fibrointegrados e parcialmente osteointegrados, de acordo com visualização microscópica) e após 3 meses, obteve-se valores médios de BIC médio de 33,4 e de 39% e valores de volume médio de 32,2 e de 44% para os grupos fibrointegrado e parcialmente osseointegrados respectivamente.

Seguindo metodologia semelhante, Nikolidakis et al., num estudo recente (em 2009) comparou implantes puros e associados a fatores de crescimento TGF-β1 em diferentes quantidades (0,5 e 1 µg) e após 6 semanas observou uma média de valores de BIC significantemente menor nos grupos experimentais (56%no grupo controle e 48 e 45% dos grupos com 0,5 e 1 µg respectivamente), porem não houve diferença entre grupos com relação a área de osso (68% no grupo controle e 65 e 66% nos grupos com 0,5 e 1 µg respectivamente).

Pesquisas contínuas em osteointegração têm aumentado a necessidade de melhora nas observações morfológicas na interface osso-titânio.

Devido a não dissolução do titânio em ácidos e produtos quelantes, há uma dificuldade de preparação dos cortes. Consequentemente, uma grande quantidade de métodos foi usada previamente removendo-se os implantes antes da preparação dos cortes (HANSSON, ALBERKTSSON e BRANEMARK, 1983).

Mais recentemente preparação de cortes com fitas diamantas, desgaste e polimento foram desenvolvidas para permitir que os implantes fossem deixados *in situ* durante os cortes (ALBREKTSSON, JOHANSSON e SENNERBY, 1994). Além disso, as observações antes possuíam limitação de método devido à extrema fragilidade dos espécimes desmineralizados.

O método de microscópio confocal laser scanning tem sido utilizados para visualizar deposição de calceína e alizarina em faixas de osso de espécimes não-desmineralizados, permitindo visualização de deposição óssea caracterizada morfologicamente em cortes de aproximadamente 500µm (NISHIKAWA et al., 2006). Além desses dois marcadores, deposição de tetraciclina em osso depositado ao redor do implante pode ser observada (SUZUKI, AOKI e OHYA, 1997).

Com esses marcadores, através de softwares de análise de imagens pode-se fazer uma analise morfométrica da porcentagem de osso depositado nos períodos marcados e a porcentagem desse osso em contanto com a superfície do implante (KOO et al., 2004), tendo uma análise mais apurada do reparo e do processo de osteointegração do implante.

Yoshimoto et al., em 2004, estudaram dois diferentes tipos de implante, sendo um convencional e outro com oxido de alumínio e obteve médias de marcação em micrometros para os marcadores. Para o grupo convencional houve marcação de uma média de 210,36 µm para alizariana, 60,16 µm para calceína e 21,99 µm para tetraciclina. Já no grupo com oxido de alumínio marcou-se 263,32 µm de alizarina, 108,79 µm de calceína e 81,35 µm de tetraciclina, mostrando uma deposição significantemente mais marcante neste grupo.

A utilização da técnica de microscopia confocal a laser deve-se a algumas vantagens oferecidas em relação à microscopia óptica convencional. A primeira dela consiste na pequena profundidade de campo, (0,5 a 1,5 µm) a partir da qual a microscopia confocal fornece informações cujos cortes apresentam-se mais bem definidos em relação a microscopia de luz convencional. As imagens florescentes desfocadas são eliminadas, resultando em maior contraste, claridade e detecção da imagem. Uma segunda vantagem apresentada é o seccionamento óptico dos espécimes, uma vez que os artefatos oriundos do seccionamento físico observados na microscopia de luz e eletrônica são eliminados. Outra significativa vantagem é o seccionamento óptico que pode ser realizado em três planos, o que permite observar, por exemplo, uma célula em profundidade, ou em lateralidade, além de reconstruir a imagem em três dimensões (KONIJN 1996; LOURENÇO JUNIOR 1998).

Além disso, a microscopia confocal a laser permite observações de índices de transmissão e reflexão do laser incidente, oferecendo índices quantitativos objetivos

quanto aos fenômenos de incorporação de marcadores aos tecidos, o que não é possível de maneira acurada em métodos calorímetros (KONIJN 1996; LOURENÇO JUNIOR, 1998).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a neoformação óssea e sua interação com implantes de titânio após enxertos de osso bovino inorgânico (Gen-Ox inorgânico®) em alvéolos de incisivos inferiores de coelhos, através de análise radiográfica, biomecanica e histomorfométrica convencional, do sistema Ekaxt e confocal a laser.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

A amostra constituiu-se de 36 coelhos brancos machos (Oryctolagos cuniculos) da raça Botucatu com aproximadamente 4 meses de vida e peso aproximado de 3,2 a 4kg.

Após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Animais, os coelhos foram adquiridos na Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – UNESP e mantidos, durante o experimento no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, em gaiolas individuais, com ração específica (Guabi – Mogiana Alimentos SA – Campinas -SP) e água a vontade.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE EXTRAÇÃO E APLICAÇÃO DE MATERIAL DE ENXERTO

Todos os animais tiveram um dos lados participando do grupo controle e o outro do grupo experimental, obtendo-se assim um modelo experimental *split mouth*.

Os animais foram anestesiados através de injeções intramusculares de Rompum® 0,25mL/Kg (correspondente a 5mg/Kg de xilazina) e de Anasedan® 0,5mL/Kg (correspondente a 50mg/Kg de hidrocloreto de ketamina).

Foi realizada anti-sepsia da boca com Clorexidina (Periogard®).

Após incisão da área entre os incisivos inferiores (Figura 1 e 2) e os primeiros molares, foi feito descolamento de mucosa e periósteo, os incisivos foram extraídos através de luxação com extrator (Figura3) e remoção com fórceps infantil adaptado (Figura 4).

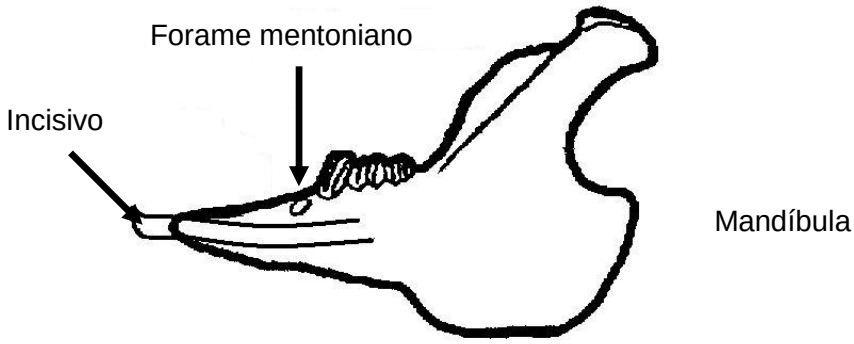


Figura 1 – Desenho esquemático da mandíbula inicial

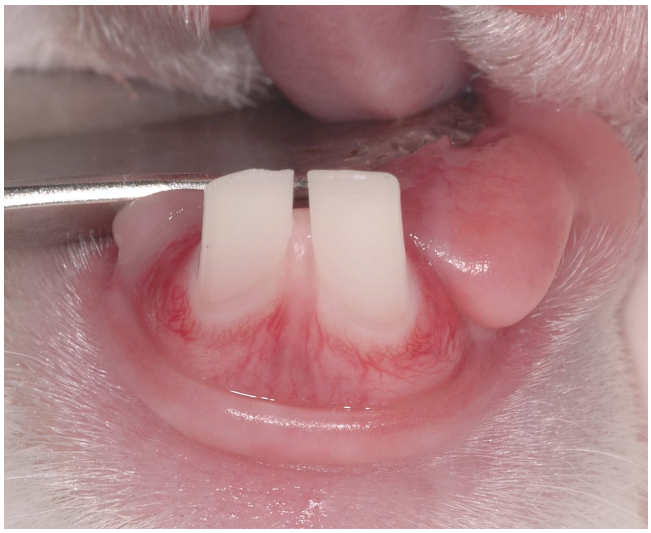


Figura 2 – Incisivos inferiores do coelho

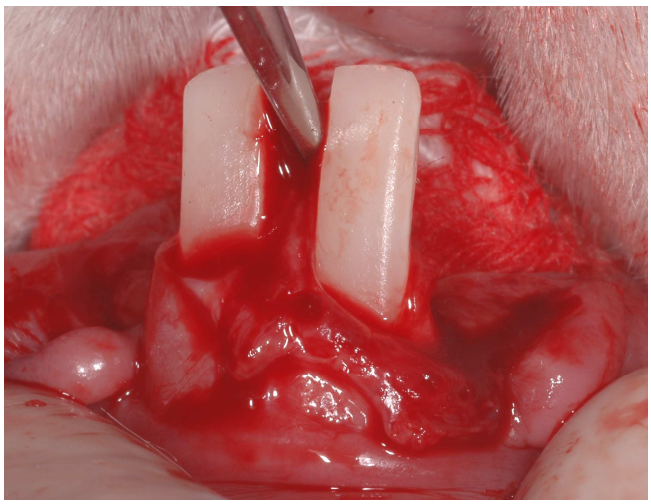


Figura 3 – Luxação com extrator após incisão e descolamento

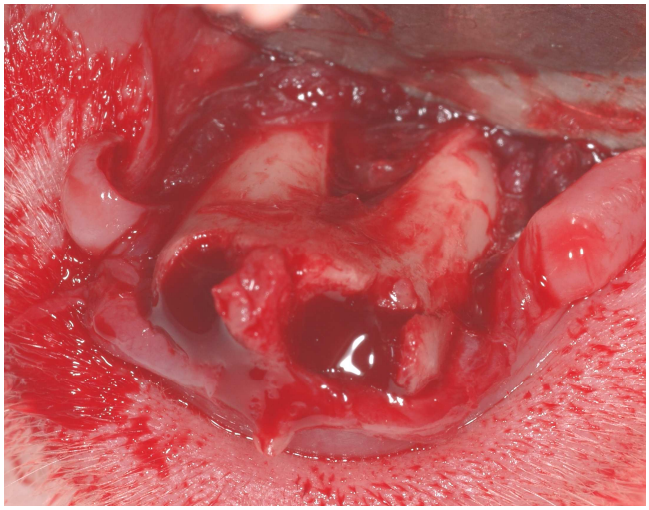


Figura 4 – Alvéolos após extração

Logo após a extração foi realizado um defeito ósseo confeccionado com broca 702 em baixa rotação sob irrigação constante em um dos lados da mandíbula, escolhido aleatoriamente, com diâmetro de aproximadamente 4 mm até chegar a região do alvéolo (Figuras 5 e 6). Tanto esse defeito quanto o alvéolo foram preenchidos com o material de enxerto (Figura 7) (Gen-Ox inorgânico®) e o alvéolo colateral serviu como controle, sendo preenchido apenas por coágulo. A sutura foi realizada com fio absorvível Vicryl 4.0 (poliglactina 910) (Figura 8).

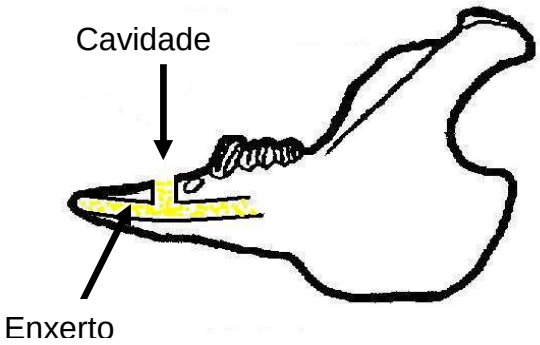


Figura 5 – Desenho esquemático da mandíbula após exodontia, confecção do defeito e enxerto

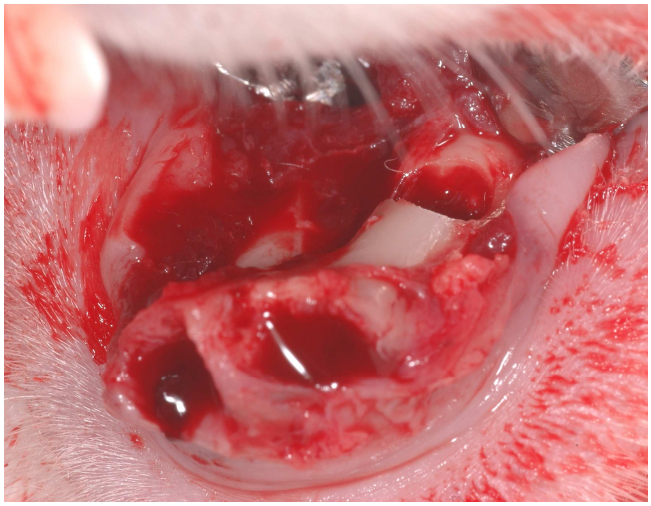


Figura 6 – Defeito confeccionado

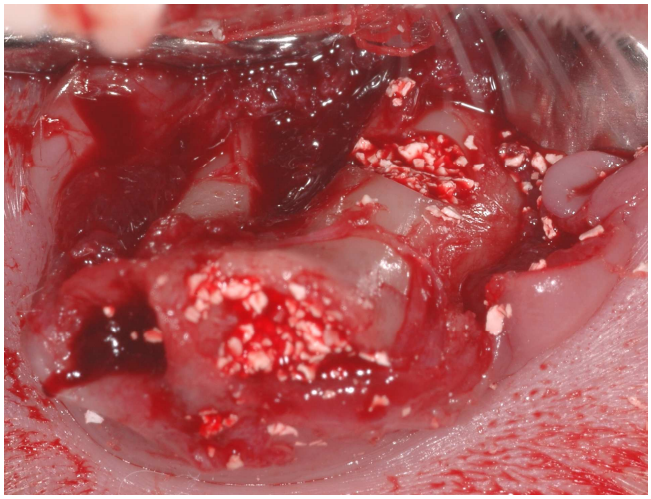


Figura 7 – Preenchimento com Gen-Ox inorgânico

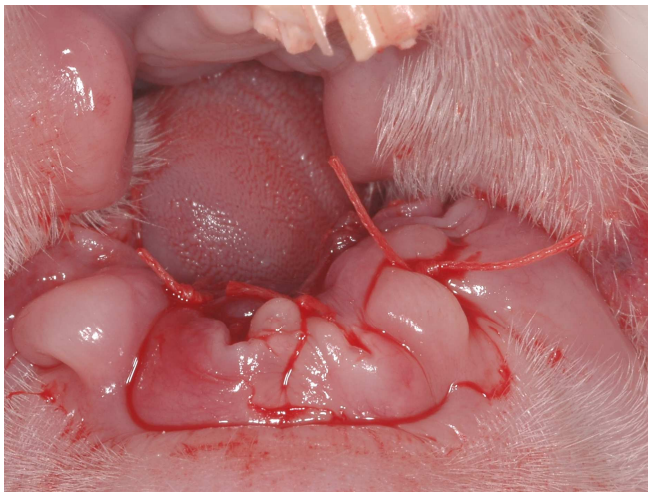


Figura 8 – Sutura

No pós-operatório imediato, durante a recuperação anestésica, os animais receberam 50ml de soro glicosado a 5% endovenoso para seu bem estar durante os primeiros dias de pós-operatório, onde há maior dificuldade de alimentação.

Foram utilizados o antiinflamatório Ketofen® 1% injetável na dose de 0,1mL/Kg (equivalente a 1mg/kg de peso de ketoprofeno) por 3 dias e o antibiótico Terramicina® injetável, com dose de 0,25ml/kg de peso (correspondente a 25mg de tetraciclina por Kg de peso), uma dose 3 dias antes do procedimento, uma logo após e outra, de reforço, 7 dias após, com injeções intramusculares.

Os animais passaram a ter seus dentes superiores aparados a cada 15 ou 20 dias para evitar traumas e dificuldade de alimentação.

4.3 INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Após um período de 60 dias, foram realizadas as cirurgias para colocação dos implantes.

Os animais foram anestesiados da mesma maneira descrita anteriormente.

Foram utilizados implantes com 3,75mm de diâmetro e 8,5 mm de comprimento, hexágono externo (Screw da Conexão Implantes – São Paulo – SP, Brasil) na região do defeito do lado experimental e na região correspondente do lado controle (Figuras 9 e 10).

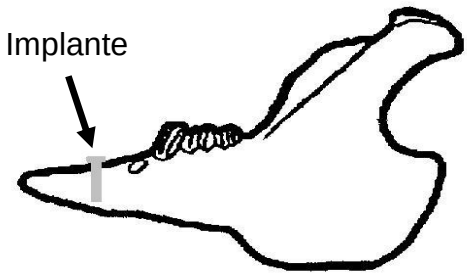


Figura 9 – Desenho esquemático da região de colocação dos implantes

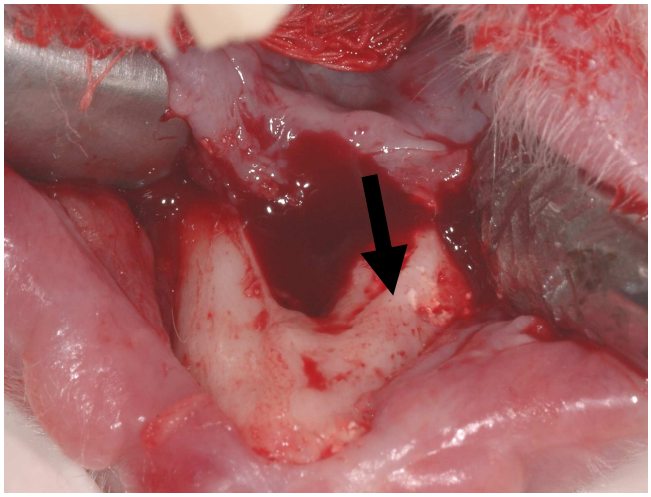


Figura 10 – Área onde foram colocados os implantes (na seta região onde foi realizado o enxerto com Gen-ox®)

O preparo das cavidades foi realizado com contra-ângulo com redução conforme preconizado pelo fabricante, sempre com irrigação constante com soro fisiológico. Em seqüência foi realizada a perfuração com a broca lança, broca helicoidal n^{o} 2, broca piloto e broca helicoidal n^{o} 3.

A colocação dos implantes foi realizada manualmente, com auxílio de chave de catraca (Figuras 11 e 12).

Após instalação dos implantes, a região foi suturada novamente com Vicryl 4.0.

Foram novamente utilizados soro glicosado, antiinflamatórios e antibióticos da forma descrita anteriormente.

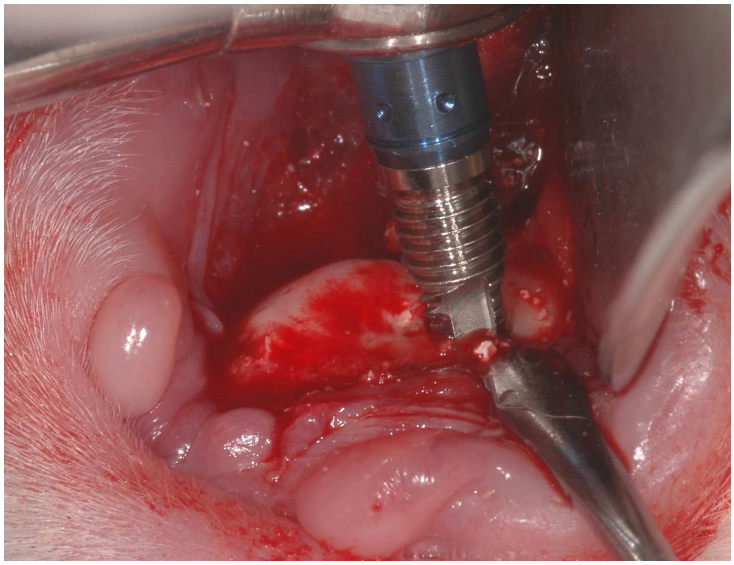


Figura 11 – Instalação do implante

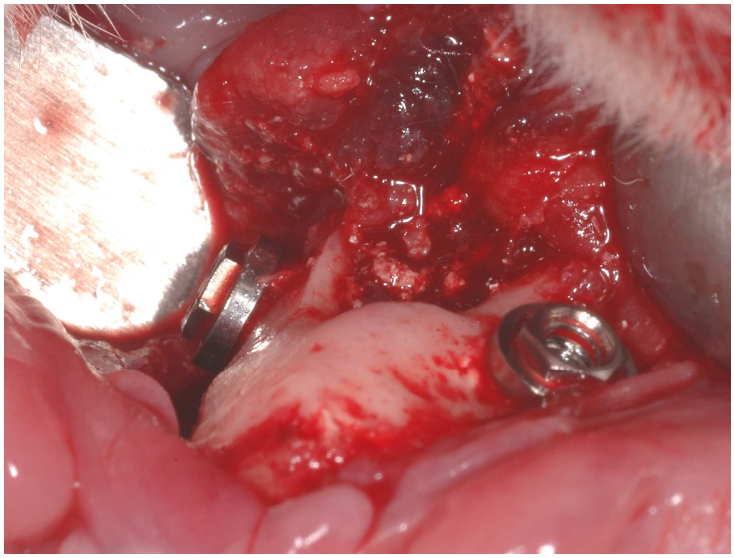


Figura 12 – Implantes instalados

4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS PEÇAS

A eutanásia foi realizada nos animais previamente anestesiados por dose já descrita de anestésico e, após anestesia profunda, foi feita injeção intra-cardíaca de cloreto de potássio 19%. As peças foram coletadas para testes biomecânicos, radiografias, e processamentos histotécnicos.

A coleta das peças foi realizada através da dissecação de tecidos e corte da mandíbula após os molares com auxílio de serras e divisão da mesma em hemimandíbulas com remoção do máximo possível de tecido mole.

A seleção dos animais para a constituição dos períodos analisados foi através de sorteio e divididos da seguinte maneira:

Período de 0 hora: animais eutanasiados imediatamente após a colocação dos implantes

Período de 1 mês: animais eutanasiados 30 dias após a colocação dos implantes

Período de 2 meses: animais eutanasiados 60 dias após a colocação dos implantes

Período de 6 meses: animais eutanasiados 180 dias após a colocação dos implantes

Os animais foram subdivididos de acordo com o tipo de análise a ser realizada:

- Para análise Biomecânica e microscópica convencional: 6 animais do período de 2 meses e 6 animais do período de 6 meses

Quatro animais foram perdidos durante o experimento e o grupo de teste biomecânico ficou com 4 animais em cada (n=4 para cada período).

- Para análise Radiográfica e Microscópica confocal e convencional no Sistema Exakt: 6 animais do Período de 0 hora, 6 animais do Período de 1 mês, 6 animais do Período de 2 meses e 6 animais do Período de 6 meses (n=6 para cada período).

4.5 ANÁLISE BIOMECÂNICA

Para essa análise através de torque de remoção, foram utilizados 4 animais do Período de 2 meses e 4 do Período de 6 meses para a análise.

A cabeça do implante foi conectada a um torquímetro digital LutronTQ8800 (Figura 13) acoplado a um computador. O gráfico do tempo e força necessária para remoção do implante, em Nm, obtidos foi registrado (Figura 14).

Figura 13 – Cabeça do implante conectada ao torquímetro

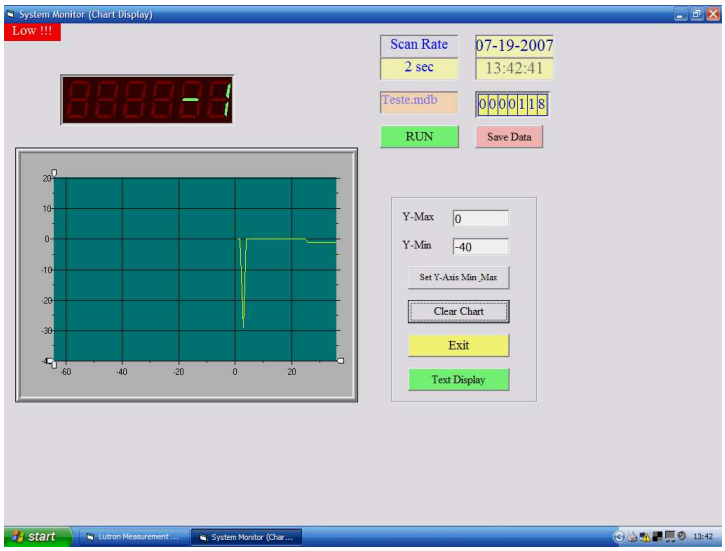


Figura 14 – Valor registrado no monitor do computador

4.6 HISTOMORFOMETRIA DA REGIÃO APÓS TESTE BIOMECÂNICO

Após a remoção, as peças foram desmineralizadas em ácido diaminotetracético (EDTA) 2% em trocas semanais por aproximadamente 3 meses. Após checagem radiográfica da desmineralização das peças, essas passaram por uma seqüência de banhos de álcool e xilol concentrados antes de serem incluídas em parafina. A solidificação dos blocos facilitou o processo de obtenção dos cortes semi-seriados com espessura da 5µm em micrótomo para a confecção das lâminas. O processamento histotécnico completo finalizou-se com coloração das laminas em hematoxilina e eosina (HE).

A análise microscópica foi realizada com o uso de microscópico ótico (binocular Carl-Zeiss - Alemanha) e auxílio do software KS300(Carl-Zeiss - Alemanha).

Os critérios para análise de osseointegração foram os mesmo utilizados por Lourenço (2002). Foram utilizadas para contagem as imagens correspondentes a três roscas apicais.

A medida linear de contato ósseo (BIC) foi realizada pelo programa, assim como as linhas de não contato e as linhas com biomaterial em contato, sendo cada linha de uma cor e estas foram somadas para obter a superfície do perímetro analisado. Foram obtidos resultados em µm e em porcentagem de osso e biomaterial.

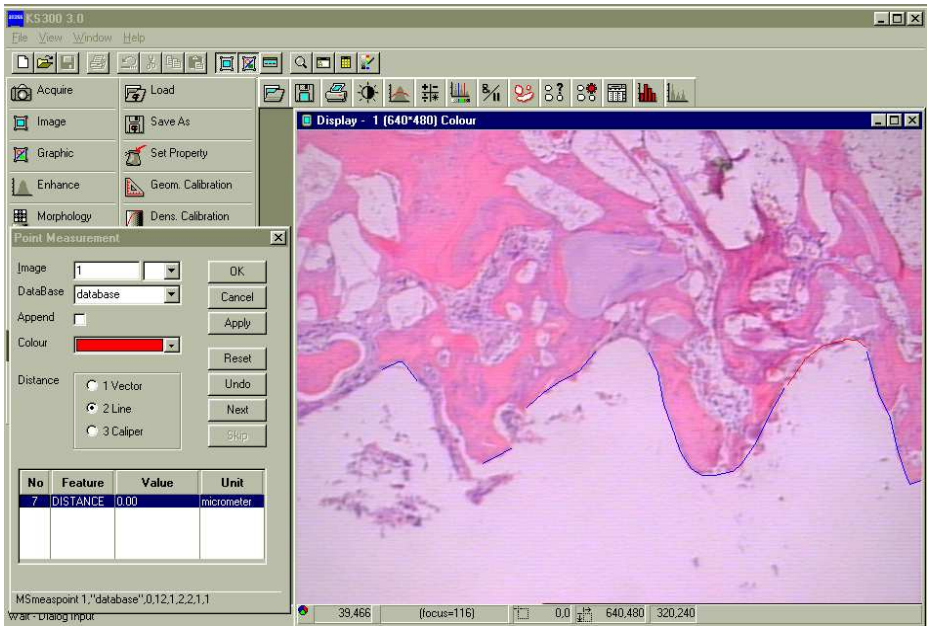


Figura 15 – Área sendo medida. Em azul contato osso implante e em vermelho contato biomaterial e implante

Na análise morfométrica foi observada a presença de tecido conjuntivo, tecido ósseo neoformado imaturo e maduro, bem como biomaterial restante, realizando-se marcação e contagem de suas proporções em porcentagens. Para tal marcação foram selecionadas áreas entre as roscas do mesmo local na região apical utilizado para analise de osteointegração. Era efetuada uma linha de divisão e naquela área eram marcadas as estruturas de interesse para contagem.

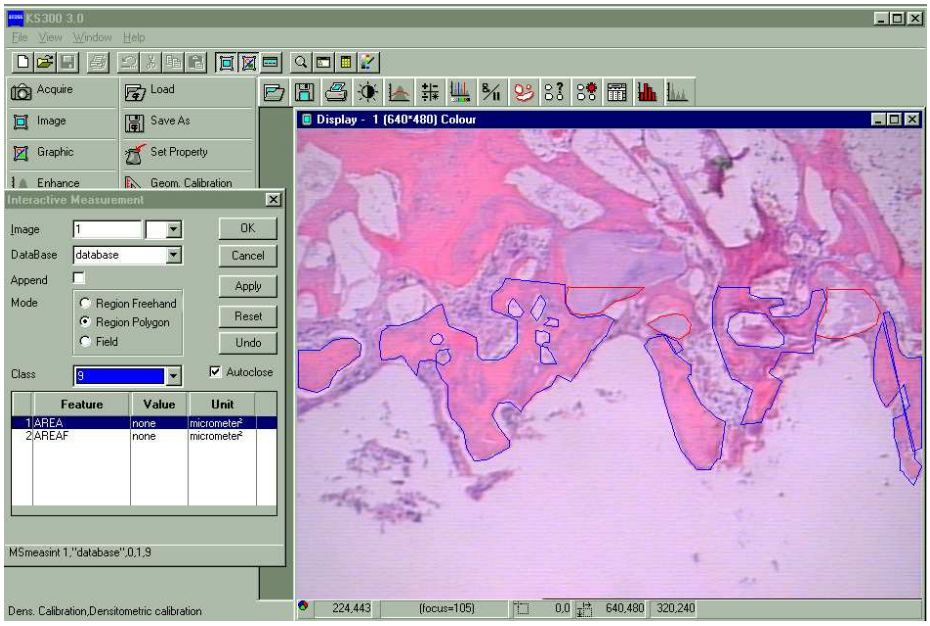


Figura 16 – Medida de volume ósseo. Área azul corresponde a osso e área vermelha a biomaterial

Finalmente, foram depois obtidas médias de todas as lâminas semi seriadas (3 laminas de cada lado do animal) em cada período e em cada grupo. Após obtenção dos resultados, esses foram submetidos a testes estatísticos apropriados (Anova a 2 critérios modelo misto e Teste de Tukey).

4.7 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Foram utilizados para essa análise 6 animais de cada período (0 hora, 1 mês, 2 meses e 6 meses), sendo o n=6.

Após coleta das peças e manutenção por 1 semana em formol fosfato tamponado 10%, foram realizadas radiografias digitais diretas do sistema Digora (Soredex Orion Corporation – Heilsink – Finlândia) utilizando-se placas de fósforo do sistema em cada hemimandíbula, com o aparelho de raios X Yoshida Kaycor X-707 operando com 70KVp e 7mA com tempo de exposição de 0,09 segundos e distância foco-filme de 40cm (Figura 17).

As imagens foram analisadas através de medidas entre a crista óssea alveolar e a plataforma do implante e de valores de pixel (histograma) na região dos alvéolos e ao redor dos implantes tanto no grupo experimental quanto no grupo controle com o Software do Digora.

Figura 17 – Imagem obtida pelo Sistema Digora

Na analise da altura da crista óssea foram feitas medidas lineares entre a crista óssea e a plataforma do implante bilateralmente e obtida uma média geral de cada implante (Figura 18).

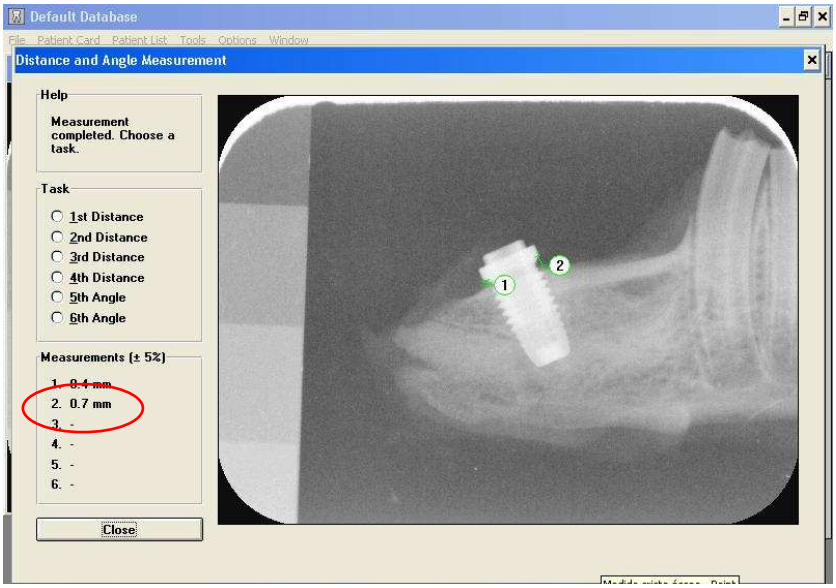


Figura 18 – Medida linear entre a crista óssea a plataforma do implante no Software do Digora

Na medida de densidade (valor de pixel) foram tomadas áreas de 30X30 pixels por toda a extensão do alvéolo (Figura 19) e obtida uma média.

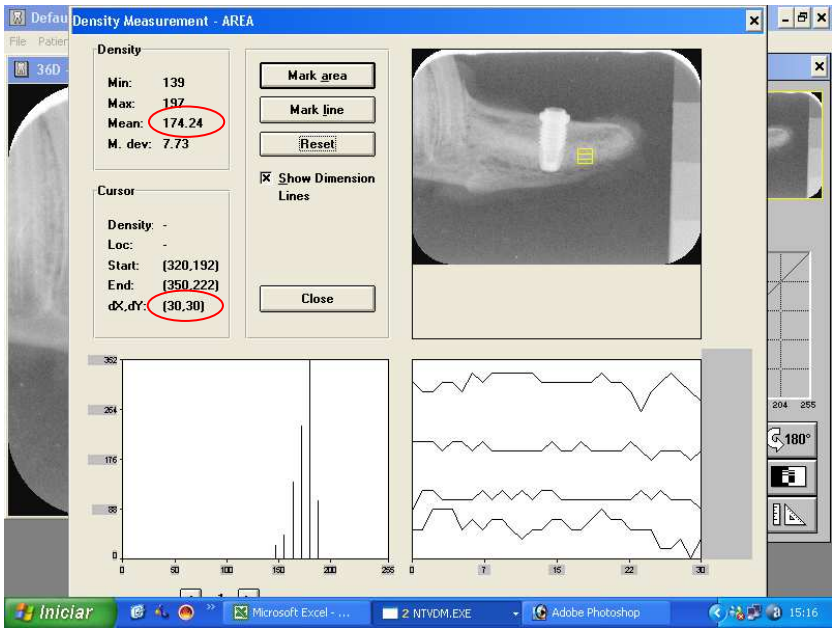


Figura 19 – Medida de densidade no Software do Digora

4.8 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO – SISTEMA EXAKT

Foram utilizados 6 animais de cada Grupo (0 hora, 1 mês, 2 meses e 6 meses) para a análise.

Marcadores de neoformação óssea para análise no microscópio confocal

Foram inoculados nos animais do grupo histológico, através de injeções intra-musculares, após a colocação dos implantes, marcadores para neoformação óssea, da seguinte maneira:

- Tetraciclina (25mg/kg de peso) no dia da colocação dos implantes e 7 dias após.
- Alizarina (30mg/kg de peso) 14 e 21 dias após a colocação dos implantes.
- Calceína (20mg/kg de peso) 45 e 52 dias após a colocação dos implantes.

Fixação das peças

As peças foram fixadas em formol fosfato tamponado 10 % por 1 semana e foram lavadas em água corrente por duas horas.

Desidratação e inclusão

A desidratação e inclusão das peças foram realizadas em uma série crescente de banhos em uma mesa agitadora do sistema Exakt (Figura 20). As peças após estarem em álcool 70° passaram por:

1º banho - em álcool absoluto por 7 dias;
2º banho - em álcool absoluto por 7 dias;
3º banho - em álcool absoluto por 7 dias;
4º banho - em 50% de glicometacrilato (Tecnnovit 7200®) + 50% de álcool etílico por 7 dias;
5º banho - em 100% de glicometacrilato (Tecnnovit 7200®) por 7 dias;
6º banho - em 100% de glicometacrilato (Tecnnovit 7200®) por 7 dias.

Após os banhos as peças foram colocadas em vácuo Plate Degasser PD3 (Edwards) por 12 horas para maior penetração da resina nos espaços medulares (Figura 21).

Figura 20 – Mesa agitadora do sistema Exakt

Figura 21 – Maquina de vácuo

As peças foram acondicionadas um molde próprio (Figura 22) e embebida com a resina para polimerização por 4 horas em luz amarela e 4 horas em luz azul.

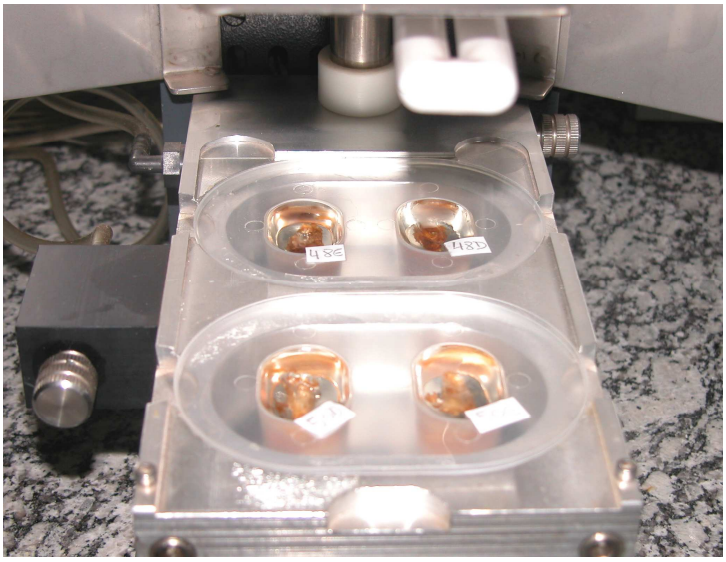


Figura 22 – Molde com as peças no sistema de polimerização

Os blocos polimerizados foram desgastados de acordo com a angulação do implante para que ficassem paralelos e logo após foram aderidos às lâminas de acrílico com adesivo (Technvit 7230) e polimerizados em luz azul por 15 min com fotopolimerizador acoplado a uma máquina de vácuo para posicionamento da lâmina (Figuras 23 e 24).

Figura 23 – Bloco e lâmina posicionados e polimerização do adesivo com luz azul

Figura 24 – Bloco aderido na lâmina identificada

4.9 CORTES E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Os blocos aderidos à lâmina foram posicionados com ajuda de vácuo no micrótomo para tecido duro do sistema Exakt (Figura 25) e as peças foram cortadas com fitas impregnadas com partículas de diamante e bornita (tamanho D64), com velocidade calibrada sob irrigação constante, até chegar à região de interesse para análise (Figuras 26 e 27).

Figura 25 – Máquina de corte do sistema Exakt

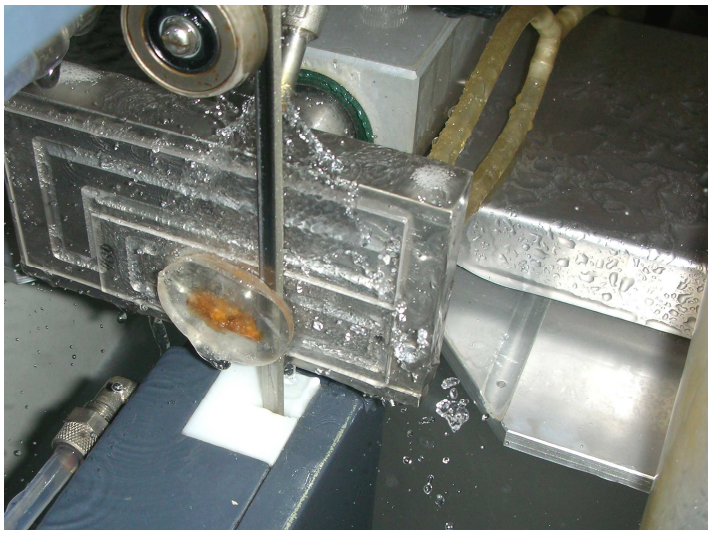


Figura 26 – Peça sendo cortada

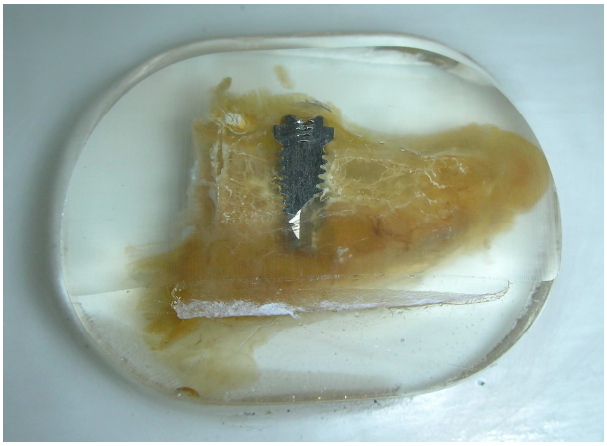


Figura 27 – Peça cortada

Após esse corte as peças passaram por um processo de desgaste e polimento na politriz do sistema Exakt (Figura 28) com lixas de granulação em ordem crescente (da granulação 600 a 2000) até chegar bem próximo ao meio do implante, com a superfície bem polida.

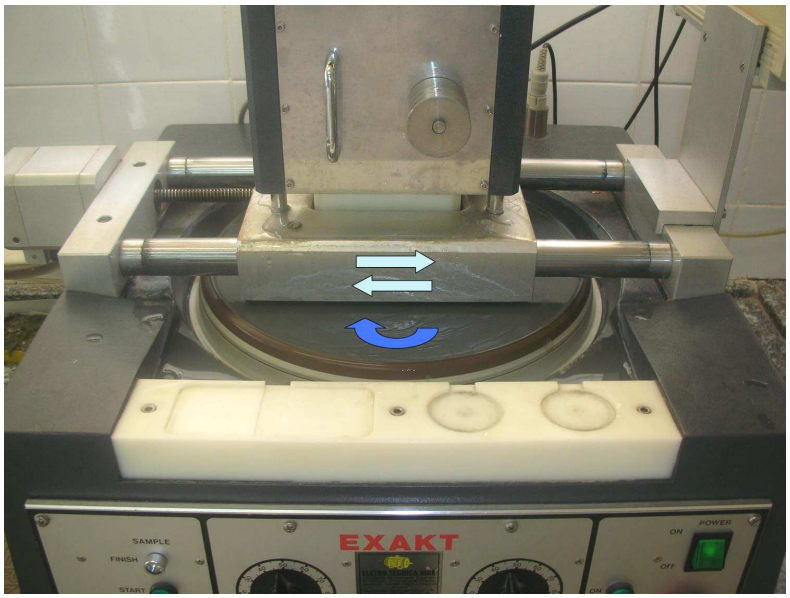


Figura 28 – Politriz do sistema Exakt com bloco sendo desgastado

Em seguida, os lados polidos dos blocos foram aderidos à lamínula para análise (Figura 29).

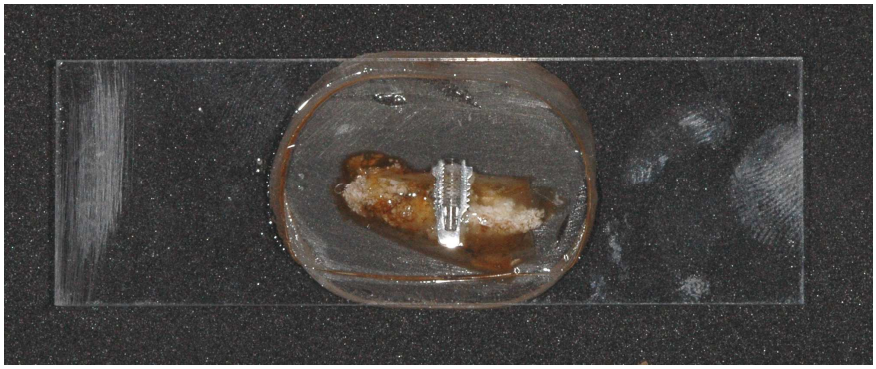


Figura 29 – Bloco aderido à lamínula

Logo após, os blocos foram novamente posicionados e cortados no micrótomo numa espessura de aproximadamente 1500- 2000µm e desgastados na Politriz na mesma seqüência de lixas até chegar à espessura de aproximadamente 100µm (Figura 30).

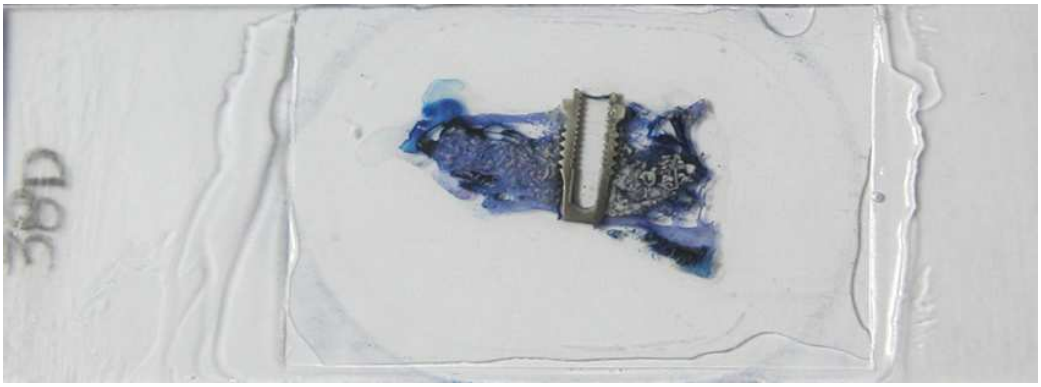


Figura 30 – Lâmina corada com azul de toluidina e lamínula aderida, pronta para análise

4.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS DO SISTEMA EXAKT

Após o termino da análise no confocal, as lâminas foram então coradas com Azul de toluidina especial para o sistema Exakt (composta de tetraborato de sódio, pironin G, azul de toluidina e água destilada) para análise em microscópio convencional.

A análise microscópica foi realizada com o uso de microscópico ótico (binocular Carl-Zeiss - Alemanha) e auxílio do software KS300 (Carl-Zeiss – Alemanha).

Os critérios para análise de osseointegração foram os mesmo já citados para o grupo após teste biomecânico (Figuras 31 e 32).

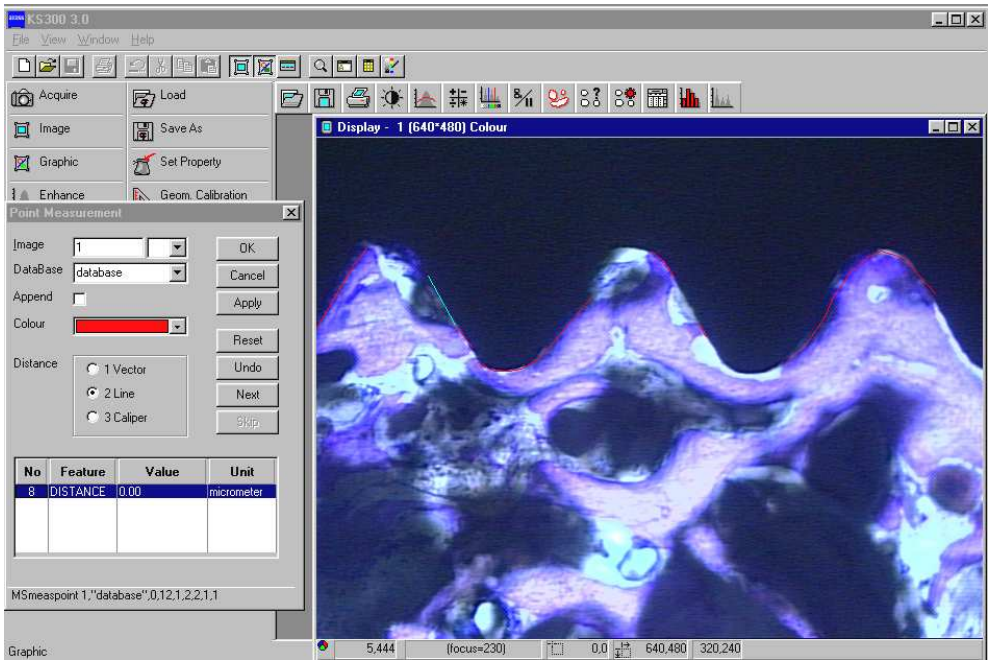


Figura 31 – Média do índice de contato osso-implante no programa. Linhas vermelhas correspondem a osso e azul claras a biomaterial

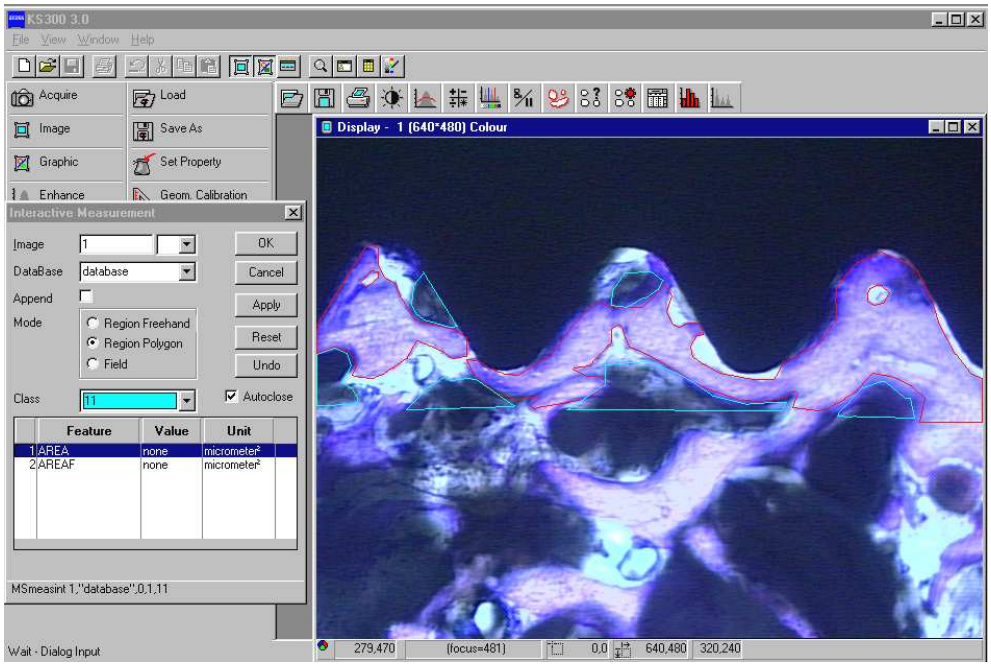


Figura 32 – Medida de área de volume ósseo no programa. Áreas em vermelho correspondem a osso e áreas em azul claro a biomaterial

Finalmente, foram depois obtidas médias de todas as lâminas em cada período e em cada grupo. Após obtenção dos resultados, esses foram submetidos a testes estatísticos apropriados (Anova a 2 critérios modelo misto e Teste de Tukey).

4.11 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COM MICROSCÓPIO CONFOCAL

Através de da utilização da fluorescência dos marcadores, os espécimes foram analisados em microscópio confocal Leica TSS SPE (Mannheim Alemanha) (Figura 33) antes das laminas terem sido coradas.

Figura 33 – Microscópio confocal Leica TSS SPE

Foram selecionadas 3 áreas distintas da superfície do implante para a análise: região apical, medial e cervical com objetiva de 10x, espessura de análise de 20 µm com seccionamento óptico a cada 1 µm, sempre numa posição padronizada, onde apareciam 2 roscas. Utilizou-se para análise fluorescências para tetraciclina (faixa espectral amarela), alizarina (faixa espectral vermelho) e calceína (faixa espectral verde) e também uma imagem em overlay com superposição dos 3 marcadores (Figura 34).

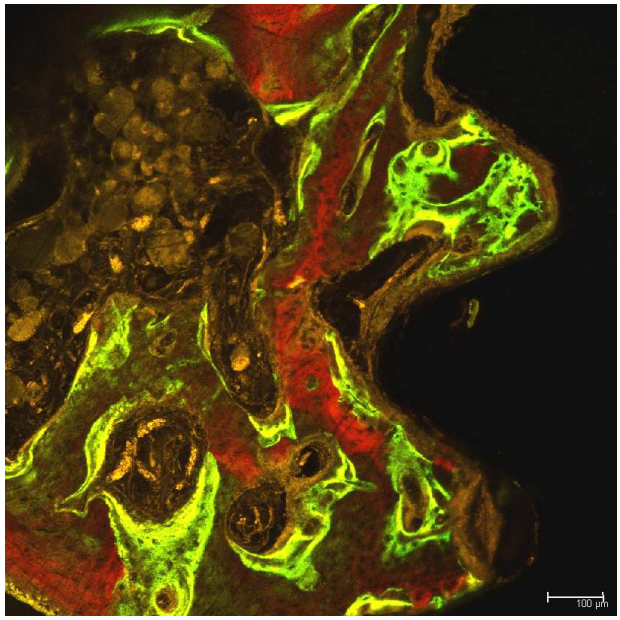


Figura 34 – Imagem obtida no microscópio confocal – Overlay (sobreposição dos 3 marcadores)

Para análise histomorfométrica da marcação utilizou-se o software KS300 (Carl-Zeiss - Alemanha), onde todas as áreas marcadas no confocal foram selecionadas no modo automático do programa (Figura 35) e quantificadas em números de área (pixel^2) e porcentagem, observando-se assim, tecido ósseo neoformado depositado nos períodos em que foram inoculados os marcadores.

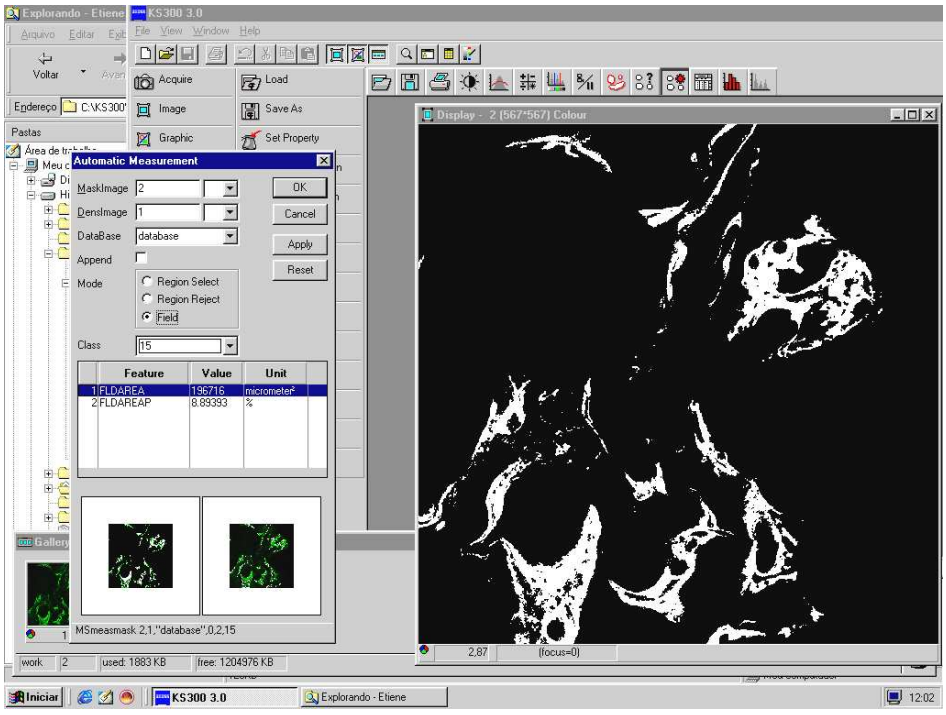


Figura 35 – Área de marcação selecionada automaticamente pelo programa e medida em pixel^2 e % registrada

Finalmente, foram depois obtidos médios de todas as lâminas em cada período, em cada terço e em cada grupo. Após obtenção dos resultados, esses foram submetidos a testes estatísticos apropriados (Anova a 3 critérios modelo misto e Teste de Tukey).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE BIOMECÂMICA (TORQUE DE REMOÇÃO)

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios modelo misto. As tabelas 1 e 3 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 1 – Dados gerais obtidos da análise biomecânica

Período	Medida (Ncm)				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
2 Meses	-19	20,41	-4,25	4,35	4
6 Meses	-15,75	20,53	-14,75	10,15	4

Tabela 2 – Resultados análise biomecânica. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	**Effect**	**Error**	**Error**	**F**	**P level**
1	1	52,56	6	219,65	0,24	0,6420
2	1	248,06	6	260,40	0,95	0,3667
1-2	1	189,06	6	260,40	0,73	0,4268

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental

Essa análise mostra que não houve variação significante do torque de remoção ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA CONVENCIONAL DOS ANIMAIS DO GRUPO TORQUE

5.2.1 Contato osso-implante (BIC)

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios modelo misto. As tabelas 3 e 4 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 3 – Dados gerais obtidos da análise biomecânica

Período	BIC µm				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
2 Meses	1143,84	1163,199	955,2008	908,6902	4
6 Meses	1163,669	899,3681	1317,155	627,923	4

Tabela 4 – Resultados análise de contato osso-implante (BIC). Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	**Effect**	**Error**	**Error**	**F**	**P level**
1	1	145758,5	6	696756,7	0,209196	0,663492
2	1	1235,757	6	994193,4	0,001243	0,973019
1-2	1	117049,5	6	994193,4	0,117733	0,743209

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental

Essa análise mostra que não houve variação significante do contato osso-implante ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos.

5.2.2 Contato osso-implante percentual (BIC em %)

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios modelo misto. As tabelas 5 e 6 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 5 – Dados gerais obtidos da análise de contato osso-implante (BIC) em %

Período	BIC %				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
2 Meses	44,48667	43,78982	39,35	35,66432	4
6 Meses	46,80333	35,08645	52,955	22,96218	4

Tabela 6 – Resultados análise biomecânica. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	**Effect**	**Error**	**Error**	**F**	**P level**
1	1	253,4995	6	1032,897	0,245426	0,637933
2	1	1,030225	6	1441,009	0,000715	0,979536
1-2	1	127,4265	6	1441,009	0,088429	0,776211

1 - Tempo; 2 - Controle X Experimental

Essa análise mostra que não houve variação significante do contato osso-implante percentual ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos.

5.2.3 Área de osso em μm^2

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios modelo misto. As tabelas 7 e 8 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 7 – Dados gerais obtidos da análise de área osso

Período	Área em μm^2				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
2 Meses	264732	187628,1	209080,9	168215,5	4
6 Meses	254391,1	191899,1	307234,8	81219,42	4

Tabela 8 – Resultados área de volume ósseo. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	1	7711115264	6	18432505856	0,418343	0,541702
2	1	7882173	6	35028815872	0,000225	0,988518
1-2	1	11771125760	6	35028815872	0,336041	0,583219

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental

Essa análise mostra que não houve variação significante do volume ósseo ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos.

5.2.4 Área de osso percentual

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios modelo misto. As tabelas 9 e 10 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 9 – Dados gerais obtidos da análise de área osso percentual

Período	Área em %				
	Controle	DP	Experimental	DP	n
2 Meses	40,51	22,23582	30,5625	25,04296	4
6 Meses	35,9775	27,18444	43,64	15,46976	4

Tabela 10 – Resultados análise de área de osso percentual. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	1	73,01702881	6	437,896637	0,166745	0,697194
2	1	5,221224785	6	612,0479126	0,008531	0,929417
12	1	310,1120911	6	612,0479126	0,506679	0,503303

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental

Essa análise mostra que não houve variação significante da área de osso em % ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos.

5.3 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS

5.3.1 Período de 2 meses

No Grupo III, período de 2 meses após a colocação do implante, no grupo controle foi observado osso (■) mais maduro em contato direto com a superfície do implante (*). No grupo experimental ainda grande quantidade de biomaterial (→) remanescente em contato direto com o implante (*).

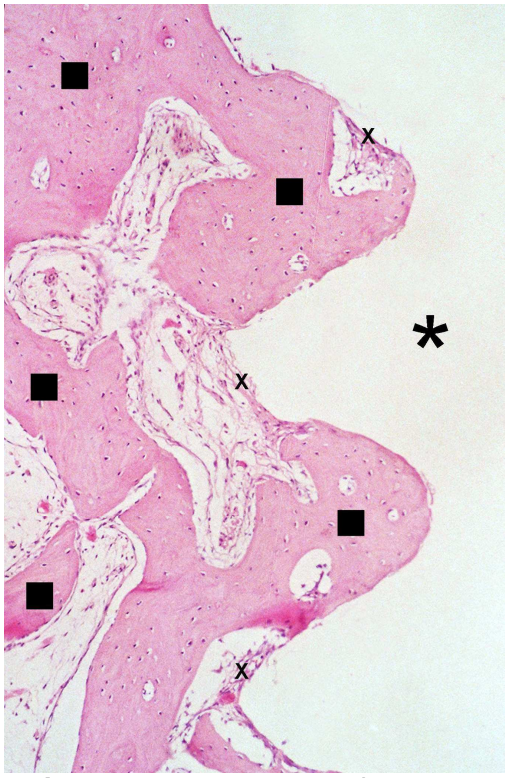


Figura 36 – Grupo controle

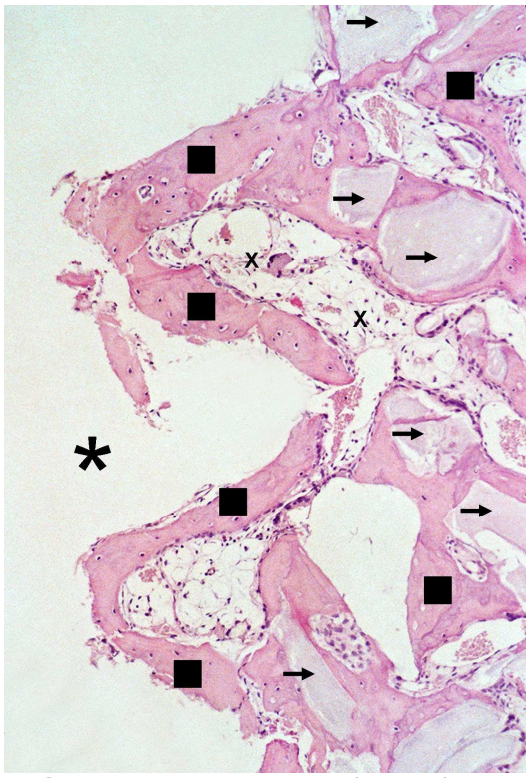


Figura 37 – Grupo experimental

5.3.2 Período de 6 meses

No Grupo IV, período de 6 meses após a colocação do implante, foram observadas no grupo controle foi observado maior quantidade de osso (■) maduro em contato direto com a superfície do implante (*). No grupo experimental, alem do osso (■) ainda há boa quantidade de biomaterial (→) remanescente, mas em menor quantidade de contato direto com o implante (*).

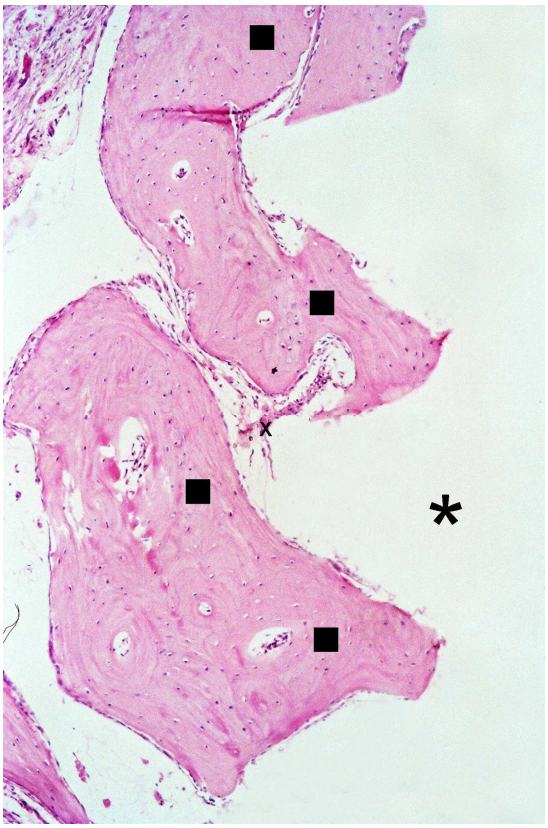


Figura 38 – Grupo controle

Figura 39 – Grupo experimental

Em áreas mais distantes da superfície do implante, pode ser observado o biomaterial (*) em contato direto com osso (■) maduro bastante celularizado e presença de osteócitos (→) na superfície em contato direto.

Figura 40 – Área de interface osso e material de enxerto

5.4 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios, modelo misto. Nos resultados em que havia significância, aplicou-se o teste de Tukey.

5.4.1 Medida linear entre a crista óssea alveolar e a plataforma do implante (mm)

Não houve diferenças significantes nem durante o tempo e nem entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados.

As tabelas 11 e 12 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 11 – Dados gerais obtidos da medida de altura entre crista óssea e plataforma do implante

Período	Medida (mm)				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
0 Hora	0,2625	0,27	0,6958	0,73	6
1 Mês	1,3833	2,27	1,4375	0,95	6
2 Meses	0,225	0,21	0,9041	1,08	6
6 Meses	1,016	1,79	1,5708	1,91	6

Tabela 12 – Resultados da medida da crista óssea a plataforma do implante. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	**Effect**	**Error**	**Error**	**F**	**P level**
1	3	2,7987	20	2,6568	1,0534	0,390835
2	1	2,2209	20	1,0370	2,1415	0,158893
1-2	3	0,2187	20	1,0370	0,2109	0,887622

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental; * significância para $p < 0,05$

Essa análise mostra que não houve variação significante da distancia entre a crista óssea e a plataforma do implante ao longo do tempo e nem houve diferença significante entre os grupos.

5.4.2 Densidade óssea (valores de pixel)

Não houve variação significante da densidade óssea em valores de pixel ao longo do tempo, mas houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, sendo maior no grupo experimental nos períodos analisados. As tabelas 13, 14 e 15 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 13 – Dados gerais obtidos da densidade óssea radiográfica

Período	Medida (valores de pixel)				
	Controle	DP	Experimental	DP	n
0 Hora	162,49	3,59	182,78	7,79	6
1 Mês	163,69	14,71	187,07	5,18	6
2 Meses	160,14	17,50	184,41	4,68	6
6 Meses	144,13	5,67	181,66	10,66	6

Tabela 14 – Resultados densidade óssea radiográfica. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	3	355,67	20	2,69	2,69	0,0737
2	1	8342,94	20	5,18	127,31	0,0000*
1-2	3	174,81	20	4,68	2,67	0,0754

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 15 – Resultados densidade óssea radiográfica, comparação entre grupos. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,000151*
2 {2}	0,000151*	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que houve variação significante da densidade óssea em valores de pixel entre os Grupos Controle e Experimental nos períodos analisados.

5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA NO SISTEMA EXAKT

Por se tratarem de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) a dois critérios, modelo misto. Nos resultados em que havia significância, aplicou-se o teste de Tukey.

5.5.1 Medida de contato osso-implante (BIC)

Não houve variação significante da medida de BIC em µm ao longo do tempo, mas houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, havendo interação entre tempos e grupos. Como houve interação, foram analisados separadamente os tempos e os grupos. As tabelas de 16 a 23 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 16 – Dados gerais obtidos da medida de BIC

Período	BIC em µm				
	Controle	DP	Experimental	DP	n
0 Hora	934,77	289,04	1813,75	586,21	6
1 Mês	1547,69	489,39	1843,11	373,06	6
2 Meses	1955,90	538,66	1863,13	574,51	6
6 Meses	1772,44	247,24	1725,78	519,67	6

Tabela 17 – Resultados da medida de BIC. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	3	593577,4	20	262160,7	2,264174	0,11222079
2	1	789473,6	20	177165,1	4,456146	0,04756242*
1-2	3	591761,5	20	177165,1	3,340169	0,03992978*

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 18 – Resultados medida de BIC, comparação entre tempos no grupo Controle. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,082656	0,00208*	0,011337*
1 mês {2}			0,339018	0,779691
2 meses {3}				0,865355
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Tabela 19 – Resultados medida de BIC, comparação entre tempos no grupo Experimental. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,999687	0,998434	0,991057
1 mês {2}			0,9999	0,979279
2 meses {3}				0,967483
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que no Grupo Controle houve variação significante da medida de BIC entre os Grupos 0 hora e 2 meses e 0 hora e 6 meses.

Tabela 20 – Resultados medida de BIC, comparação entre grupos no grupo 0 hora. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,016318*
2 {2}	0,016318*	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 21 – Resultados medida de BIC, comparação entre grupos no grupo 1 mês. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,289921
2 {2}	0,289921	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 22 – Resultados medida de BIC, comparação entre grupos no grupo 2 meses. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,659616
2 {2}	0,659616	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 23 – Resultados medida de BIC, comparação entre grupos no grupo 6 meses. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,871624
2 {2}	0,871624	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Comparando-se separadamente entre tempos através dos testes de Tukey, observou-se que no grupo Controle houve diferenças entre os grupos 0 hora e 2 meses e 0 hora e 6 meses e não houve diferenças no grupo Experimental.

Já na comparação dos Grupos, no houve diferenças significantes entre eles no período de 0 Hora, sendo o grupo Experimental maior.

5.5.2 Contato osso-implante percentual (BIC %)

Não houve variação significante da medida de BIC percentual ao longo do tempo, mas houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, havendo interação entre tempos e grupos. Como houve interação, foram analisados separadamente os tempos e os grupos.

As tabelas 24 a 31 sumarizam os resultados obtidos. O gráfico da figura 3 ilustra o comportamento destas medidas.

Tabela 24 – Dados gerais obtidos da medida de índice de BIC em %

Período	**BIC (%)**				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
0 Hora	36,32	11,25	70,31	23,02	6
1 Mês	58,18	18,95	70,91	13,08	6
2 Meses	73,75	16,10	69,98	21,68	6
6 Meses	69,43	9,42	65,46	19,54	6

Tabela 25 – Resultados da medida de índice de BIC em %. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	3	751,3018	20	341,5399	2,199748	0,11969531
2	1	1139,483	20	261,382	4,359455	0,04980412*
1-2	3	967,7988	20	261,382	3,702623	0,02872657*

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 26 – Resultados medida de índice de BIC em %, comparação entre tempos no grupo Controle. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,071394	0,001313*	0,003974*
1 mês {2}			0,273212	0,544231
2 meses {3}				0,953782
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Tabela 27 – Resultados medida de índice BIC em %, comparação entre tempos no grupo Experimental. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,999953	0,999991	0,973926
1 mês {2}			0,999819	0,963745
2 meses {3}				0,978781
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que no Grupo Controle houve variação significante da medida de BIC entre os Grupos 0 hora e 2 meses e 0 hora e 6 meses

Tabela 28 – Resultados medida de índice de BIC em %, comparação entre grupos no grupo 0 Hora. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,01197*
2 {2}	0,01197*	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 29 – Resultados medida de índice BIC em %, comparação entre grupos no grupo 1 Mês. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,237282
2 {2}	0,237282	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 30 – Resultados medida de índice BIC em %, comparação entre grupos no grupo 2 meses. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,641627
2 {2}	0,641627	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 31 – Resultados medida de índice de BIC em %, comparação entre grupos no grupo 6 meses. Teste de Tukey

	{1}	{2}
1 {1}		0,735568
2 {2}	0,735568	

1 - Controle, 2 - Experimental; * significância para p < 0,05

Comparando-se separadamente entre tempos através dos testes de Tukey, observou-se que no grupo Controle diferenças entre os grupos de 0 hora e de 2 meses e entre o de 0 hora e de 6 meses e não houve diferenças no grupo Experimental.

Já na comparação dos Grupos, no houve diferenças significantes entre eles no período de 0 Hora, sendo o grupo Experimental maior.

5.5.3 Área de osso em μm^2

Não houve diferenças significantes nem durante o tempo e nem entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados.

As tabelas 32 e 33 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 32 – Dados gerais obtidos da medida de área de osso em μm^2

Período	Área (μm^2)				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
0 Hora	159885,3	52318,85	271827,5	112025,3	6
1 Mês	187395,1	54127,2	246288,9	63657,18	6
2 Meses	251771	85074,45	255538,4	88292,42	6
6 Meses	259259,6	136586,8	234712,4	82016,15	6

Tabela 33 – Resultados da medida de área óssea. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	**Effect**	**Error**	**Error**	**F**	**P level**
1	3	4707047936	20	10594040832	0,444311	0,72395688
2	1	16887630848	20	5077144064	3,326207	0,08316432
1-2	3	10987086848	20	5077144064	2,164029	0,12406671

1 - Tempo; 2 - Controle X Experimental; * significância para $p < 0,05$

5.5.4 Área de osso em %

Não houve diferenças significantes nem durante o tempo e nem entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados.

As tabelas 34 e 35 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 34 – Dados gerais obtidos da medida de área de osso em %

Período	Área de osso (%)				
	Controle	**DP**	**Experimental**	**DP**	**n**
0 Hora	39,19	11,31	64,58	27,76	6
1 Mês	43,72	9,96	53,63	12,37	6
2 Meses	54,94	19,15	55,43	18,27	6
6 Meses	62,97	33,69	50,62	21,20	6

Tabela 35 – Resultados da medida área de osso em %. Análise de Variância a 2 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	3	156,1106873	20	557,998291	0,279769	0,83933926
2	1	412,4268799	20	301,1661072	1,369433	0,25566548
1-2	3	758,0060425	20	301,1661072	2,516904	0,08738171

1 - Tempo, 2 - Controle X Experimental; * significância para p < 0,05

5.6 DESCRIÇÃO DOS PERÍODOS E GRUPOS

As imagens a serem descritas foram observadas e capturadas em objetiva de 10X, de modo que pudessem ser observadas as 3 roscas mais apicais.

5.6.1 Período de 0 Hora

No período de 0 hora foi observada uma menor quantidade de contato osso-implante no grupo controle. Pode ser observado no grupo Controle (Figura 41) a área do implante (*) em contato com o osso (■), e tecido conjuntivo (×). Já no Experimental (Figura 42) pode ser observado o biomaterial (→) em contato com o osso (■) adjacente sem a presença de tecido conjuntivo, assim como em contato com a superfície do implante (*).

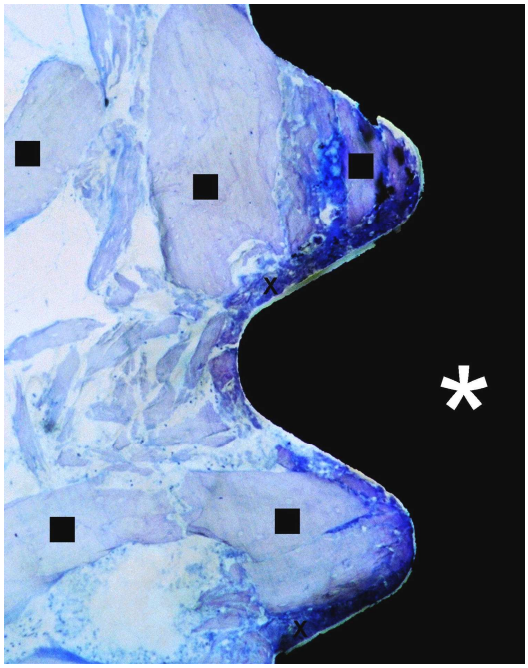


Figura 41 – Grupo controle

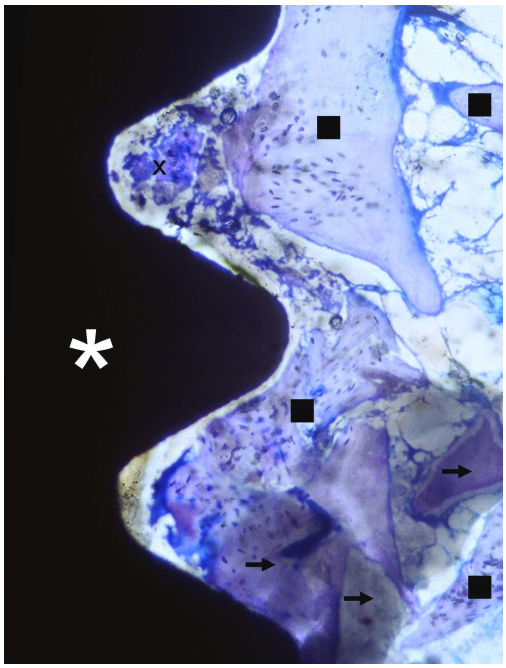


Figura 42 – Grupo experimental

5.6.2 Período de 1 mês

No período de 1 mês após a instalação dos implantes, no grupo controle (Figura 43) foram observados trabeculado ósseo (■) ainda imaturo, presença de osso em contato com o implante(*) e tecido conjuntivo também(×). Já no experimental (Figura 44), além de osso(■), foi encontrada presença de biomaterial (→) em contato direto com a superfície do implante (*).

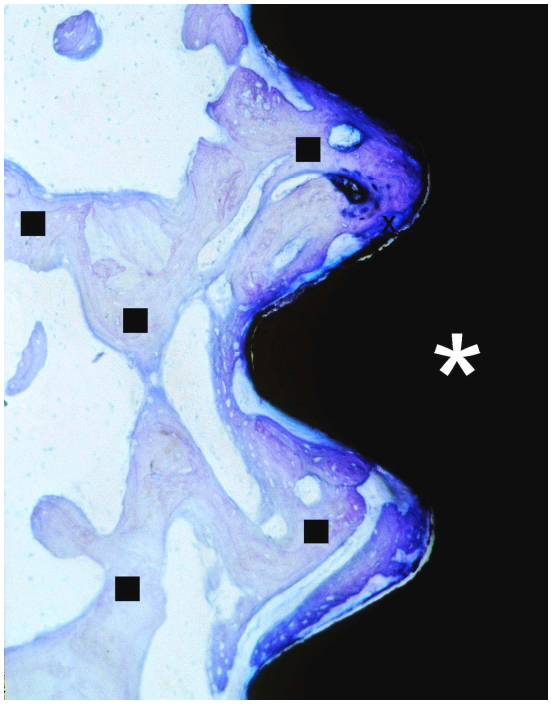


Figura 43 – Grupo controle

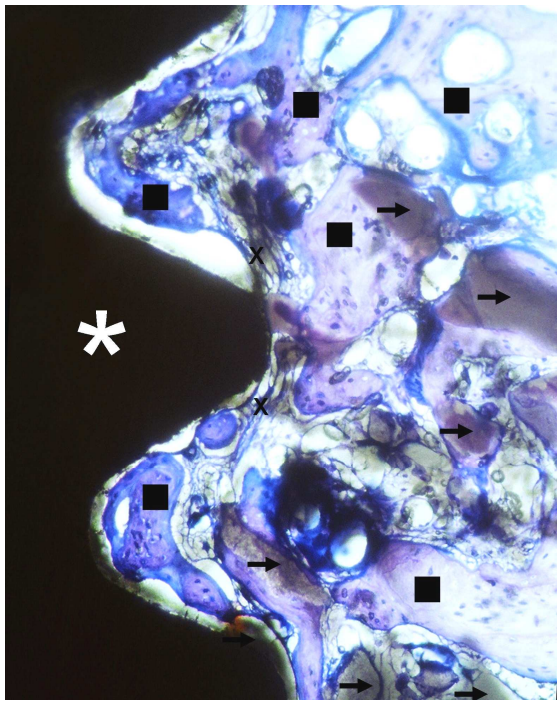


Figura 44 – Grupo experimental

5.6.3 Período de 2 meses

No período de 2 meses após a instalação dos implantes, no grupo controle (Figura 45) foi observado osso (■) mais maduro em contato direto com a superfície do implante (*). No grupo experimental (Figura 46) ainda grande quantidade de biomaterial (→) remanescente em contato direto com o implante (*).

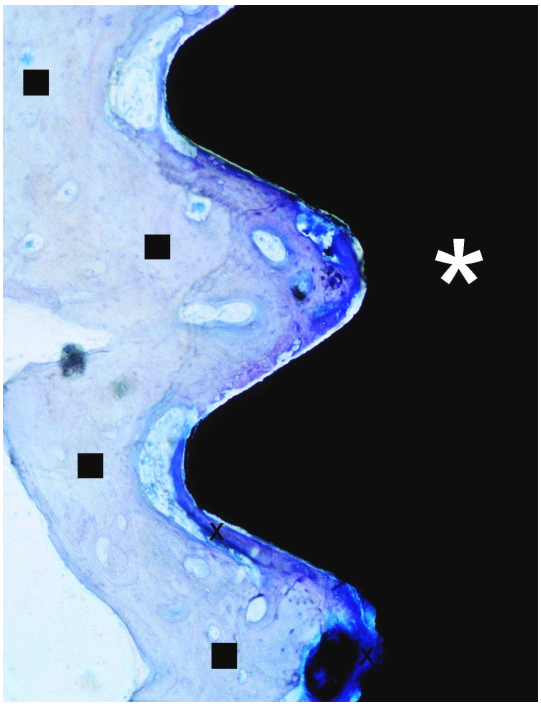


Figura 45 – Grupo controle

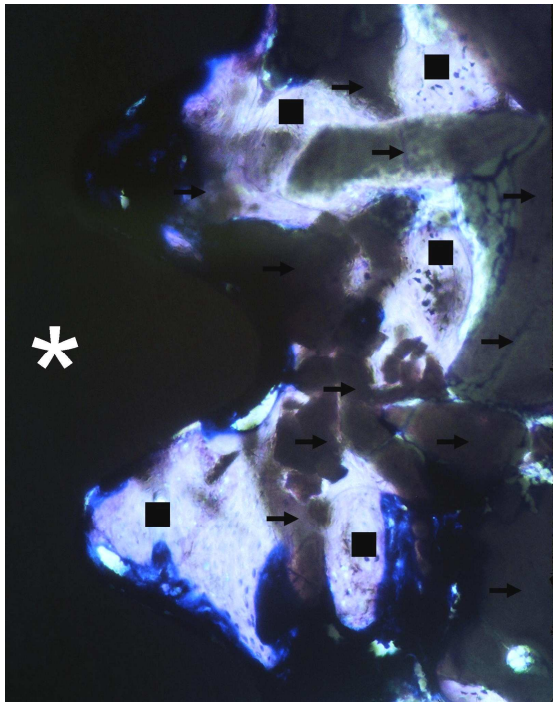


Figura 46 – Grupo experimental

5.6.4 Período de 6 meses

No período de 6 meses após a instalação dos implantes, no grupo controle (Figura 47) foi observado maior quantidade de osso (■) maduro em contato direto com a superfície do implante (*). No grupo experimental (Figura 48), alem do osso (■) ainda há boa quantidade de biomaterial (→) remanescente, mas em menor quantidade de contato direto com o implante (*).

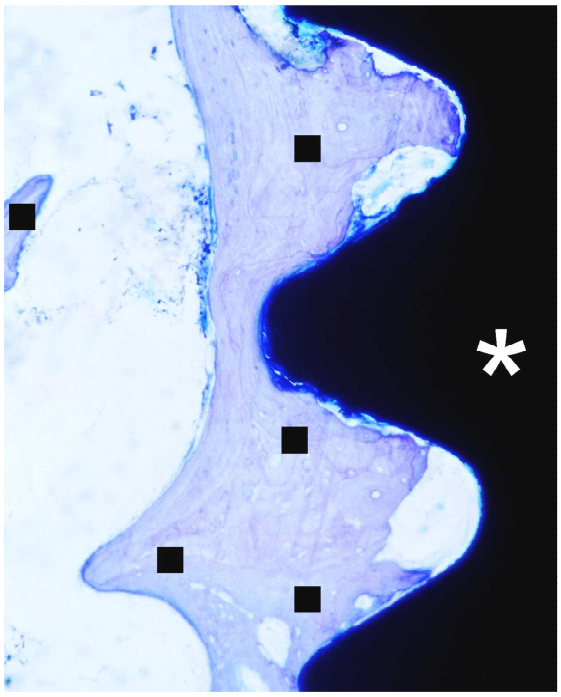


Figura 47 – Grupo controle

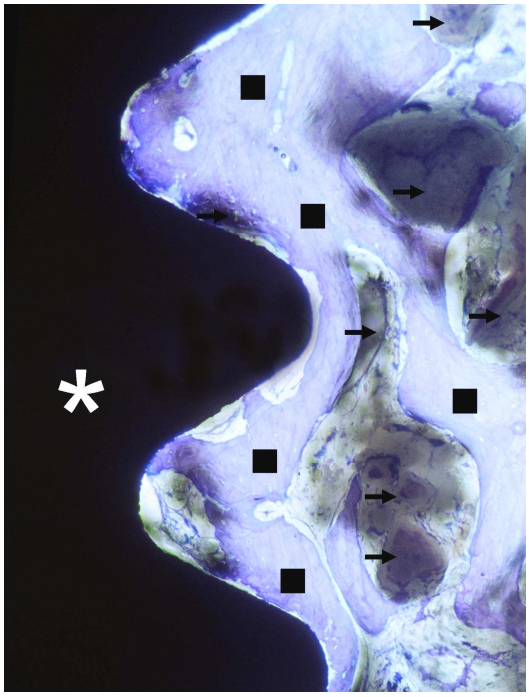


Figura 48 – Grupo experimental

Em áreas mais distantes da superfície do implante, pode ser observado o biomaterial (*) em contato direto com osso maduro bastante celularizado.

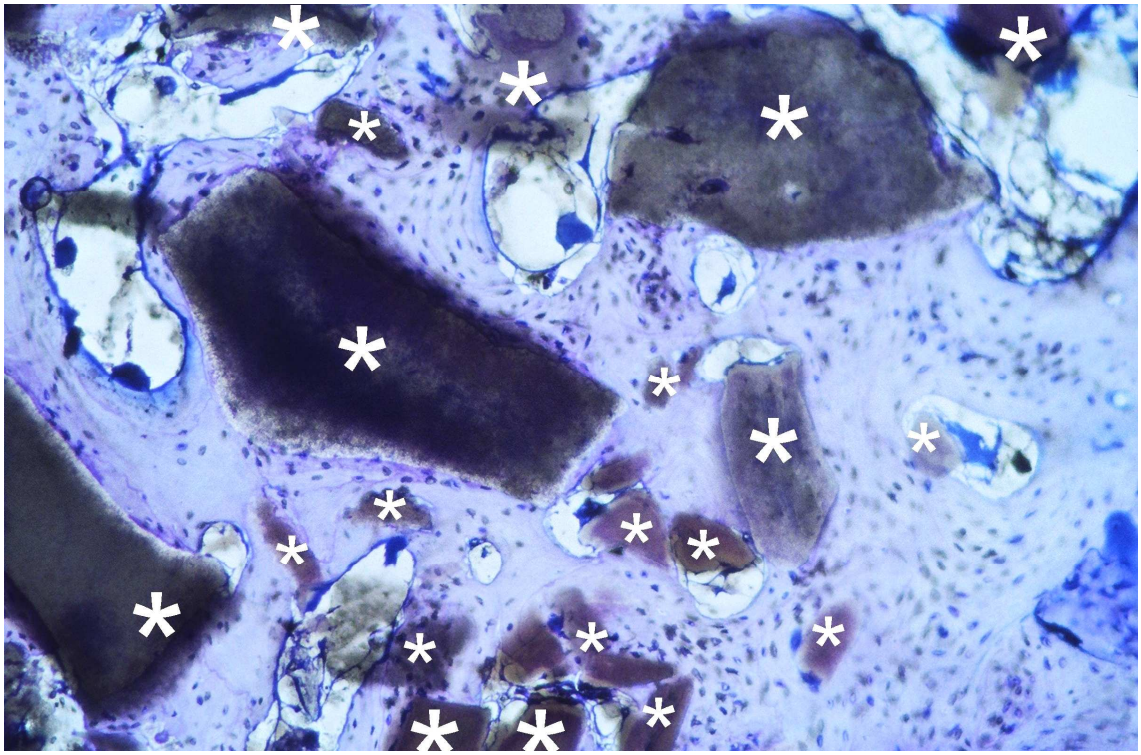


Figura 49 – Área de interface osso e material de enxerto

Em maior aumento (40X) pode ser observado contato direto de osso e biomaterial (*) com presença de osteócitos (→) na superfície em contato direto.

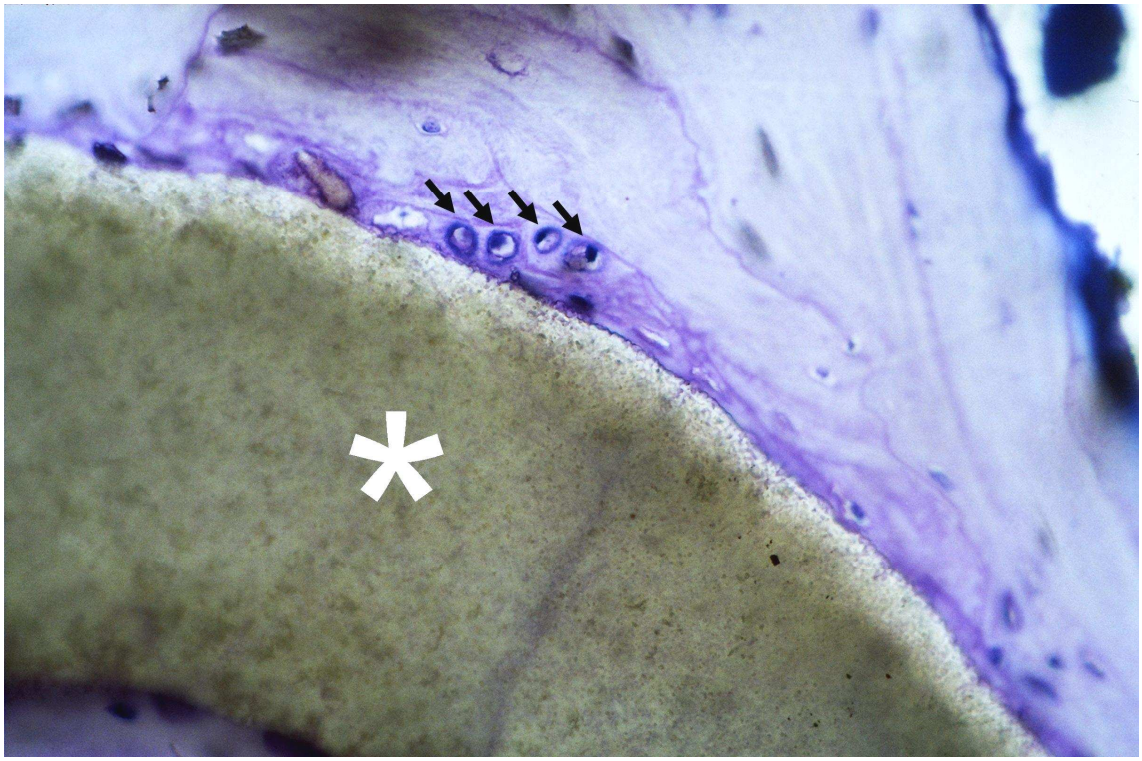


Figura 50 – Área de interface osso e material de enxerto (x40)

5.7 ANÁLISE DAS IMAGENS DO MICROSCÓPIO CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

5.7.1 Marcador tetraciclina

5.7.1.1 Área de marcação em pixel^2

Esse marcador foi observado em todos os períodos e houve diferenças durante o tempo e entre os terços analisados, houve também interação entre terços e tempo, porém não houve diferenças entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados.

As tabelas 36 a 44 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 36 – Dados gerais obtidos da medida de marcação de tetraciclina

Terço	Grupos	Períodos				n
		0 Hora	1 mês	2 meses	6 meses	
Apical	**Controle**	65972,83	65732,33	47952,83	18506,33	6
	DP	36348,05	39963,8	31632,08	11837,39	6
	Experimental	67909	73248	68761,17	31929,83	6
	DP	32413,25	18842,05	56750,46	33196,79	6
Médio	**Controle**	50184,5	52124,67	42822,17	15358,67	6
	DP	17843,68	15475,08	13220,01	9542,339	6
	Experimental	57439,5	58617,67	54604,17	37804,83	6
	DP	18405,56	21752,62	20828,15	35522,79	6
Cervical	**Controle**	65511,17	36842,33	45640,17	45640,17	6
	DP	14817,68	7790,834	15996,27	15996,27	6
	Experimental	64340,67	50079,67	49426,5	49426,5	6
	DP	25481,36	26989,11	14419,89	14419,89	6

Tabela 37 – Resultados da medida área de Tetraciclina. Análise de Variância a 3 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	3	5575006720	20	825437440	6,754003	0,0025051*
2	2	948151168	40	550962432	1,7209	0,19188614
3	1	3096885504	20	841902464	3,678437	0,06951224
1-2	6	1329956096	40	550962432	2,413878	0,04379022*
1-3	3	201883472	20	841902464	0,239794	0,8675437
2-3	2	174939280	40	578392960	0,302457	0,74067503
1-2-3	6	132657992	40	578392960	0,229356	0,96466899

1 - Tempo, 2 - Terço, 3 - Controle X Experimental; * significância para $p < 0,05$

Tabela 38 – Resultados medida de marcação de Tetraciclina comparação entre tempos no Terço apical. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,9976536	0,921434	0,0291237*
1 mês {2}			0,846107	0,0195263*
2 meses {3}				0,1035
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Tabela 39 – Resultados medida de marcação de Tetraciclina comparação entre tempos no Terço médio. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,99743009	0,921133	0,0150439*
1 mês {2}			0,842957	0,0098642
2 meses {3}				0,0569182
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Tabela 40 – Resultados medida de marcação de Tetraciclina comparação entre tempos no Terço cervical. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,07928258	0,193217	0,193217
1 mês {2}			0,961072	0,9610718
2 meses {3}				1
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que nos Terços apical e médio houve variações significantes da marcação de Tetraciclina entre os Grupos 0 hora e 6 meses e entre 1 mês e 6 meses.

Tabela 41 – Resultados medida da marcação Tetraciclina, comparação entre terço no período de 0 Hora. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}
Apical {1}		0,26718318	0,965078
Médio {2}			0,374975
Cervical {3}			

1 - Apical, 2 - Médio, 3 - Cervical, * significância para p < 0,05

Tabela 42 – Resultados medida Tetraciclina, comparação entre terço no período de 1 mês. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}
Apical {1}		0,48721701	0,121961
Médio {2}			0,593048
Cervical {3}			

1 - Apical, 2 - Médio, 3 - Cervical, * significância para p < 0,05

Tabela 43 – Resultados medida Tetraciclina, comparação entre terço no período de 2 meses. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}
Apical {1}		0,56846821	0,495993
Médio {2}			0,991154
Cervical {3}			

1 - Apical, 2 - Médio, 3 - Cervical, * significância para p < 0,05

Tabela 44 – Resultados medida Tetraciclina, comparação entre terço no período de 6 meses. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}
Apical {1}		0,98698676	0,070259
Médio {2}			0,090093
Cervical {3}			

1 - Apical, 2 - Médio, 3 - Cervical, * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que não houve diferença entre os terços nos diferentes períodos analisados.

5.7.1.2 Área de marcação em %

Esse marcador foi observado nos períodos de 0 hora, 1, 2 e 6 meses e houve diferenças entre os tempos, porém não houve diferenças entre os terços e nem entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados. As tabelas 45 a 47 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 45 – Dados gerais obtidos da medida de marcação de tetraciclina em %

Terço	Grupos	Períodos				n
		0 Hora	1 mês	2 meses	6 meses	
Apical	**Controle**	20,52067	20,455	14,91533	5,755333	6
	DP	11,30606	12,4329	9,839113	3,682142	6
	Experimental	21,12267	22,7835	12,87415	9,9315	6
	DP	10,08223	5,86103	4,875677	10,32606	6
Médio	**Controle**	15,60983	16,21317	13,31967	4,777	6
	DP	5,550274	4,8137	4,112069	2,968104	6
	Experimental	17,86833	18,23283	16,958	11,76033	6
	DP	5,724488	6,766461	6,451834	11,04797	6
Cervical	**Controle**	20,377	11,45933	14,151	8,603167	6
	DP	4,609299	2,423399	4,917382	10,66025	6
	Experimental	20,01283	15,5105	15,37367	10,632	6
	DP	7,926058	8,290031	4,485279	7,019463	6

Tabela 46 – Resultados da medida área de Tetraciclina em %. Análise de Variância a 3 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	3	785,535522	20	100,27135	7,834098	0,00119029
2	2	42,1458244	40	54,135754	0,778521	0,46591562
3	1	180,953842	20	58,950886	3,069569	0,09509052
1-2	6	76,6587677	40	54,135754	1,416047	0,23250008
1-3	3	25,9033813	20	58,950886	0,439406	0,72730738
2-3	2	20,4506817	40	34,626293	0,590611	0,55874681
1-2-3	6	10,4379673	40	34,626293	0,301446	0,9324801

1 - Tempo, 2 - Terço, 3 - Controle X Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 47 – Resultados medida de marcação de Tetraciclina em %, comparação entre tempos. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}	{4}
0 hora {1}		0,8685174	0,231745	0,0012228*
1 mês {2}			0,631054	0,0063857*
2 meses {3}				0,0820296
6 meses {4}				

1 - 0 Hora, 2 - 1 Mês, 3 - 2 Meses e 4 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que houve variação significante da marcação de Tetraciclina em % entre os Grupos 0 hora e 6 meses e entre 1 mês e 6 meses em ambos os Grupos e todos os Terços.

5.7.2 Marcador alizarina

5.7.2.1 Área de marcação em pixel^2

Esse marcador foi observado nos períodos de 1, 2 e 6 meses e houve diferenças entre os tempos, porém não houve diferenças entre os terços e nem os grupos controle e experimental nos períodos analisados. As tabelas 48 a 50 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 48 – Dados gerais obtidos da medida de marcação de alizarina

Terço	Grupos	Períodos			n
		1 mês	2 meses	6 meses	
Apical	**Controle**	72855,66	65973	31691	6
	DP	18528,68	20132,21	19491,25	6
	Experimental	66438,5	95187	32839,5	6
	DP	8118,875	53630,4	10746,17	6
Médio	**Controle**	74713,83	91376,17	25397	6
	DP	26517,69	37160,79	22179,07	6
	Experimental	54772,17	72902,5	37681	6
	DP	19054,8	20123,27	9980,477	6
Cervical	**Controle**	73758,5	86592,33	44729	6
	DP	22146,65	32433,33	28986,98	6
	Experimental	62105,17	78857,17	44200,67	6
	DP	16079,05	31931,05	18483,02	6

Tabela 49 – Resultados da medida área de Alizariana. Análise de Variância a 3 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	2	19681624064	15	707781952	27,80747	0,0000090*
2	2	303306368	30	604185280	0,502009	0,61030811
3	1	162845088	15	751126784	0,216801	0,64817703
1-2	4	209316208	30	604185280	0,346444	0,84437221
1-3	2	728814144	15	751126784	0,970294	0,40153247
2-3	2	745030400	30	605060032	1,231333	0,30623588
1-2-3	4	708650560	30	605060032	1,171207	0,34324056

1 - Tempo, 2 - Terço, 3 - Controle X Experimental; * significância para $p < 0,05$

Tabela 50 – Resultados medida de marcação de Alizarina comparação entre tempos. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}
1 mês {1}		0,087989986	0,000575*
2 meses {2}			0,000181*
6 meses {3}			

1- 1 Mês, 2 - 2 Meses e 3 - 6 meses, * significância para $p < 0,05$

Essa análise mostra que houve variação significante da marcação de Alizarina entre os Grupos 1 mês e 6 meses e entre 2 meses e 6 meses em ambos os Grupos e todos os Terços.

5.7.2.2 Área de marcação em %

Esse marcador foi observado em todos os períodos e houve diferenças entre os tempos, porém não houve diferenças entre os grupos controle e experimental nos períodos analisados. As tabelas 51 a 53 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 51 – Dados gerais obtidos da medida de marcação de Alizarina em %

Terço	Grupos	Períodos			n
		1 mês	2 meses	6 meses	
Apical	**Controle**	22,6615	20,5	9,857	6
	DP	5,763438	6,283552	6,062936	6
	Experimental	20,66533	29,5985	10,21433	6
	DP	2,525586	16,68917	3,342712	6
Médio	**Controle**	23,2915	28,42233	7,899333	6
	DP	8,248675	11,55909	6,899068	6
	Experimental	17,03667	22,676	11,7205	6
	DP	5,927176	6,259506	3,104521	6
Cervical	**Controle**	22,94217	26,9345	13,91283	6
	DP	6,888563	10,0886	9,016507	6
	Experimental	19,31733	23,77817	13,70333	6
	DP	5,001329	10,63725	5,813789	6

Tabela 52 – Resultados da medida área de Alizarina em %. Análise de Variância a 3 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	2	1878,011108	15	70,651382	26,58138	0,0000117*
2	2	24,55760574	30	58,598846	0,41908	0,66144228
3	1	19,81983948	15	76,889404	0,257771	0,6190393
1-2	4	21,83533859	30	58,598846	0,372624	0,8262583
1-3	2	68,50344086	15	76,889404	0,890935	0,43090534
2-3	2	75,80430603	30	57,836678	1,310661	0,28463957
1-2-3	4	70,48023224	30	57,836678	1,218608	0,32366207

1 - Tempo, 2 - Terço, 3 - Controle X Experimental; * significância para p < 0,05

Tabela 53 – Resultados medida de marcação de Alizarina comparação entre tempos. Teste de Tukey

	{1}	{2}	{3}
1 mês {1}		0,106155396	0,000636*
2 meses {2}			0,000182*
6 meses {3}			

1 - 1 Mês, 2 - 2 Meses e 3 - 6 meses, * significância para p < 0,05

Essa análise mostra que houve variação significante da marcação de Alizarina em % entre os Grupos 1 mês e 6 meses e entre 2 meses e 6 meses em ambos os Grupos e todos os Terços.

5.7.3 Marcador calceína

5.7.3.1 Área de marcação em pixel^2

Esse marcador foi observado nos períodos de 2 e 6 meses e não houve diferenças entre os tempos, terços e os grupos controle e experimental nos períodos analisados. As tabelas 54 e 55 sumarizam os resultados obtidos

Tabela 54 – Dados gerais obtidos da medida de marcação de calceína

Terço	Grupos	Períodos		n
		2 meses	6 meses	
Apical	**Controle**	37772,67	11586,83	6
	DP	57534,62	17613,63	6
	Experimental	19811,67	2780,5	6
	DP	17366,7	2954,879	6
Médio	**Controle**	42832,33	14719,67	6
	DP	52029,89	19355,54	6
	Experimental	16098,33	26220,83	6
	DP	19539,96	34917,85	6
Cervical	**Controle**	27196,83	18892,33	6
	DP	14593,34	37053,14	6
	Experimental	17826,67	6809,833	6
	DP	19606,24	5532,329	6

Tabela 55 – Resultados da medida área de Calceína. Análise de Variância a 3 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	1	3242419712	10	2428705792	1,33504	0,2747716
2	2	407615424	20	302764064	1,346314	0,28278223
3	1	2013131008	10	1331222912	1,512242	0,2469442
1-2	2	302292000	20	302764064	0,998441	0,38609019
1-3	1	998039488	10	1331222912	0,749716	0,40685993
2-3	2	49994176	20	470904160	0,106166	0,89977843
1-2-3	2	665799744	20	470904160	1,413875	0,26648253

1 - Tempo, 2 - Terço, 3 - Controle X Experimental; * significância para $p < 0,05$

Essa análise mostra que não houve variação significante da marcação de Calceína entre os Períodos, os Grupos e os Terços.

5.7.3.2 Área de marcação em %

Esse marcador foi observado nos períodos de 2 e 6 meses e não houve diferenças entre os tempos, terços e os grupos controle e experimental nos períodos analisados. As tabelas 56 e 57 sumarizam os resultados obtidos.

Tabela 56 – Dados gerais obtidos da medida de marcação de calceína em %

Terço	Grupos	Períodos		n
		2 meses	6 meses	
Apical	**Controle**	11,74867	3,604	6
	DP	17,89616	5,478748	6
	Experimental	6,162	0,864333	6
	DP	5,402059	0,919092	6
Médio	**Controle**	13,3225	4,577667	6
	DP	16,18401	6,019803	6
	Experimental	5,006833	8,155333	6
	DP	6,078133	10,86133	6
Cervical	**Controle**	8,464	5,876667	6
	DP	4,545922	11,52521	6
	Experimental	5,544667	2,117667	6
	DP	6,098717	1,720737	6

Tabela 57 – Resultados da medida área de Calceína em %. Análise de Variância a 3 Critérios (ANOVA) modelo misto

	Effect	Effect	Error	Error	F	P level
1	1	313,826416	10	235,01059	1,335371	0,2747156
2	2	39,40329361	20	235,01059	1,344724	0,28317878
3	1	194,8864441	10	128,7635	1,513522	0,24675757
1-2	2	29,22740555	20	29,302145	0,997449	0,3864384
1-3	1	96,61426544	10	128,7635	0,750323	0,40667668
2-3	2	4,839233398	20	45,570694	0,106192	0,89975578
1-2-3	2	64,38923645	20	45,570694	1,412953	0,266698

1 - Tempo, 2 - Terço, 3 - Controle X Experimental; * significância para $p < 0,05$

Essa análise mostra que não houve variação significante da marcação de Calceína entre os Períodos, os Grupos e os Terços.

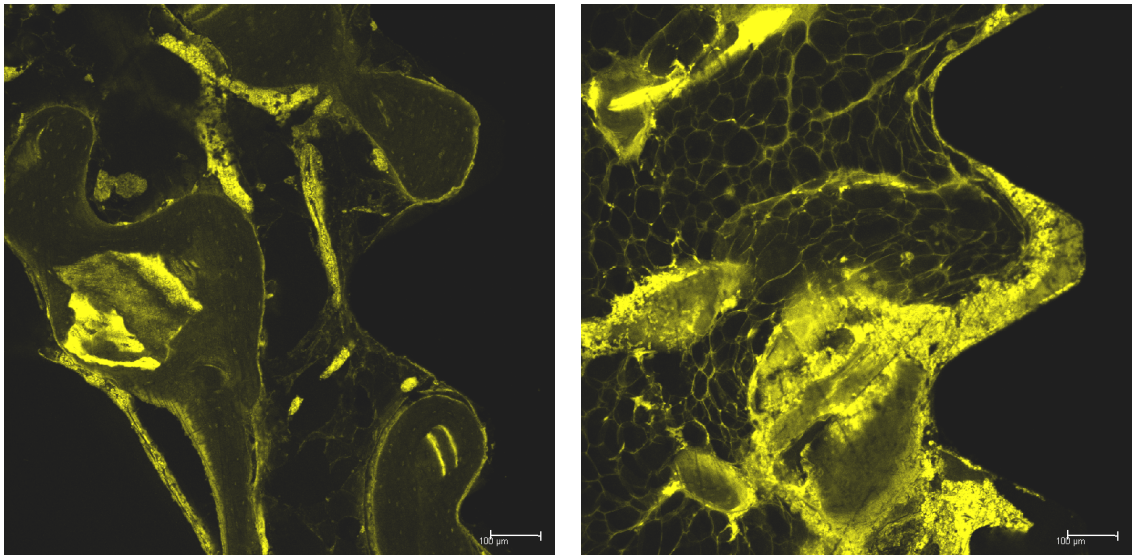
5.7.4 Descrição dos períodos e grupos

5.7.4.1 Período de 0 Hora

No período de Zero hora foi observado fraca marcação de tetraciclina que pode ser observado nas figuras com coloração amarela, em ambos os grupos controle e experimental.

No grupo controle (Figura 51) houve marcação 20,52% na região apical. Na região média, 15,60% da área total. Já na região cervical foi marcada 20,37% de área.

Já no grupo experimental (Figura 52) houve marcação de 21,12% na região apical. Na região média 17,86% da área total. Já na região cervical foi marcada 20,01% de área.

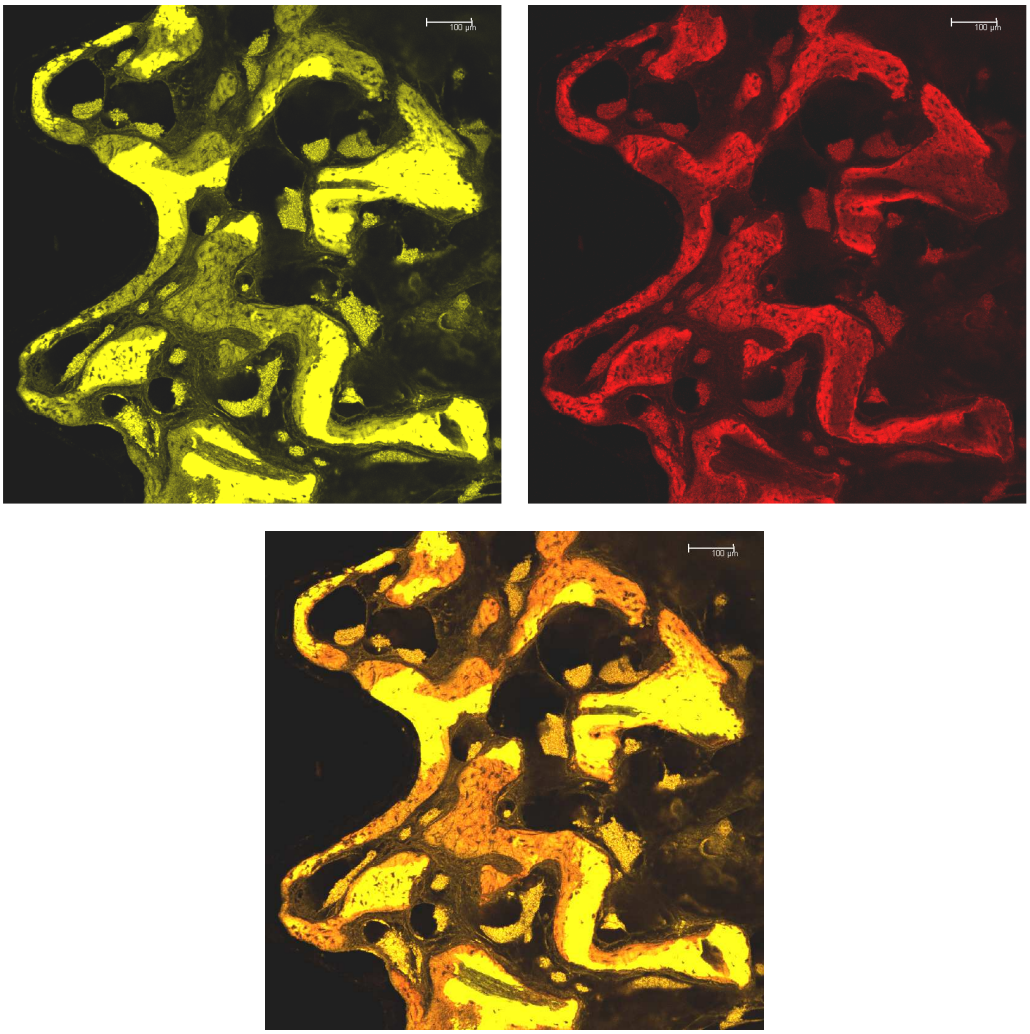


Figuras 51 e 52 – Grupo controle e experimental no período de 0 hora. Marcação de tetraciclina que pode ser vista na cor amarela

5.7.4.2 Período de 1 Mês

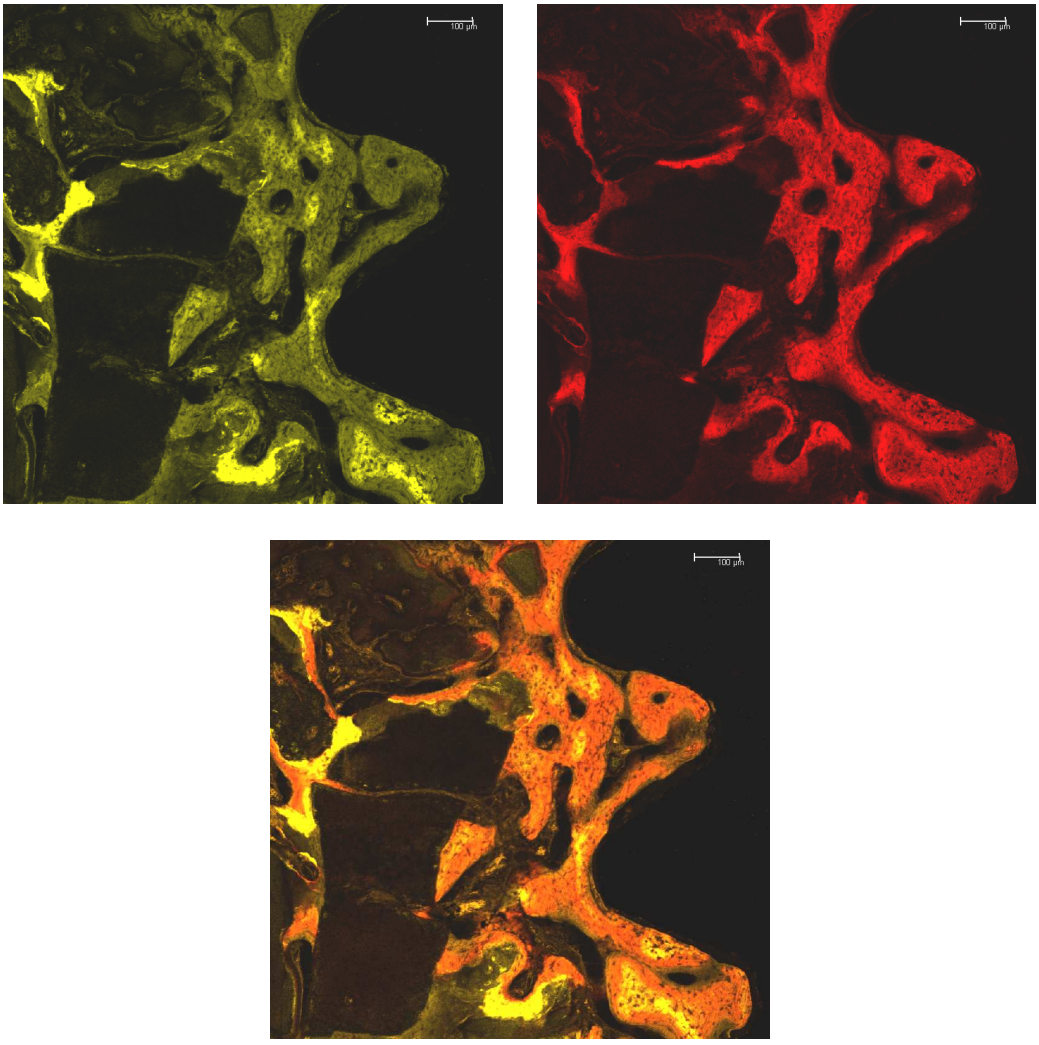
No período de 1 mês após a instalação do implante, foram observadas marcações de tetraciclina (em amarelo) que foram inoculadas logo após a cirurgia e 7 dias após (Figuras 53 e 56) e marcação com alizarina (em vermelho) que foi inoculada 14 e 21 dias após (Figuras 54 e 57).

No grupo controle foi observado marcação para tetraciclina no terço apical de 20,45% e para alizarina de 22,66%. No terço médio houve marcação de 16,21% de tetraciclina e 23,29% de alizarina. Já no terço cervical, houve marcação de tetraciclina de 11,45% e de alizarina 22,94% (Figuras 55 e 58).



Figuras 53, 54 e 55 – Grupo Controle período de 1 mês da tetraciclina, alizarina e em overlay, coloração amarela significa tetraciclina e vermelha alizarina. Na overlay, como houve sobreposição de marcadores, a alizarina ficou alaranjada

No grupo experimental foi observada marcação para tetraciclina no terço apical de 22,78% e para de 20,66%. No terço médio houve marcação de 18,23% de tetraciclina e 17,03% de alizarina. Já no terço cervical, houve marcação de tetraciclina numa de 15,51% e de 19,31%.



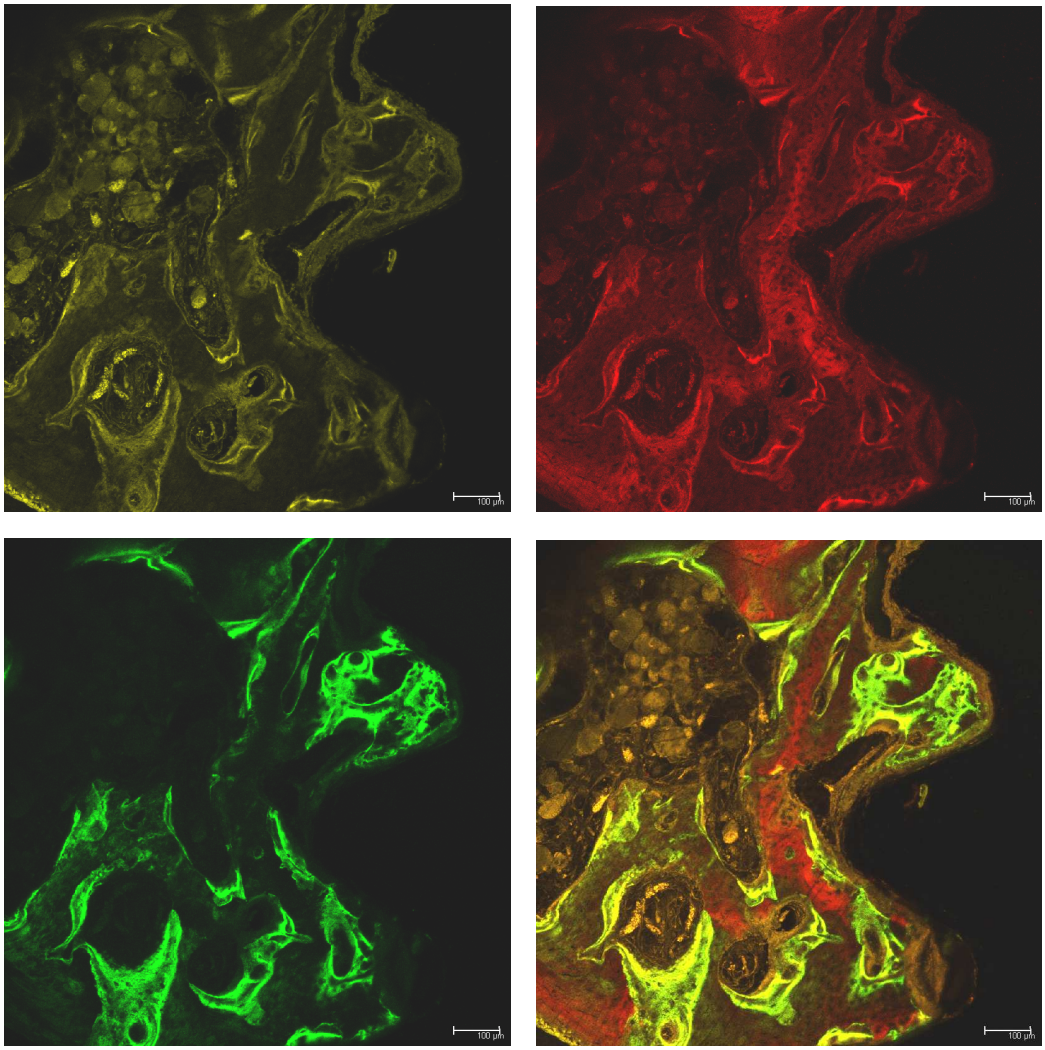
Figuras 56, 57 e 58 – Grupo Experimental período de 1 mês da tetraciclina, alizarina e em overlay, coloração amarela significa tetraciclina e vermelha alizarina. Na overlay, como houve sobreposição de marcadores, a alizarina ficou alaranjada

5.7.4.3 Período de 2 Meses

No período de 2 meses após a colocação do implante, foram observadas marcações de tetraciclina (em amarelo) que foram inoculadas logo após a cirurgia e

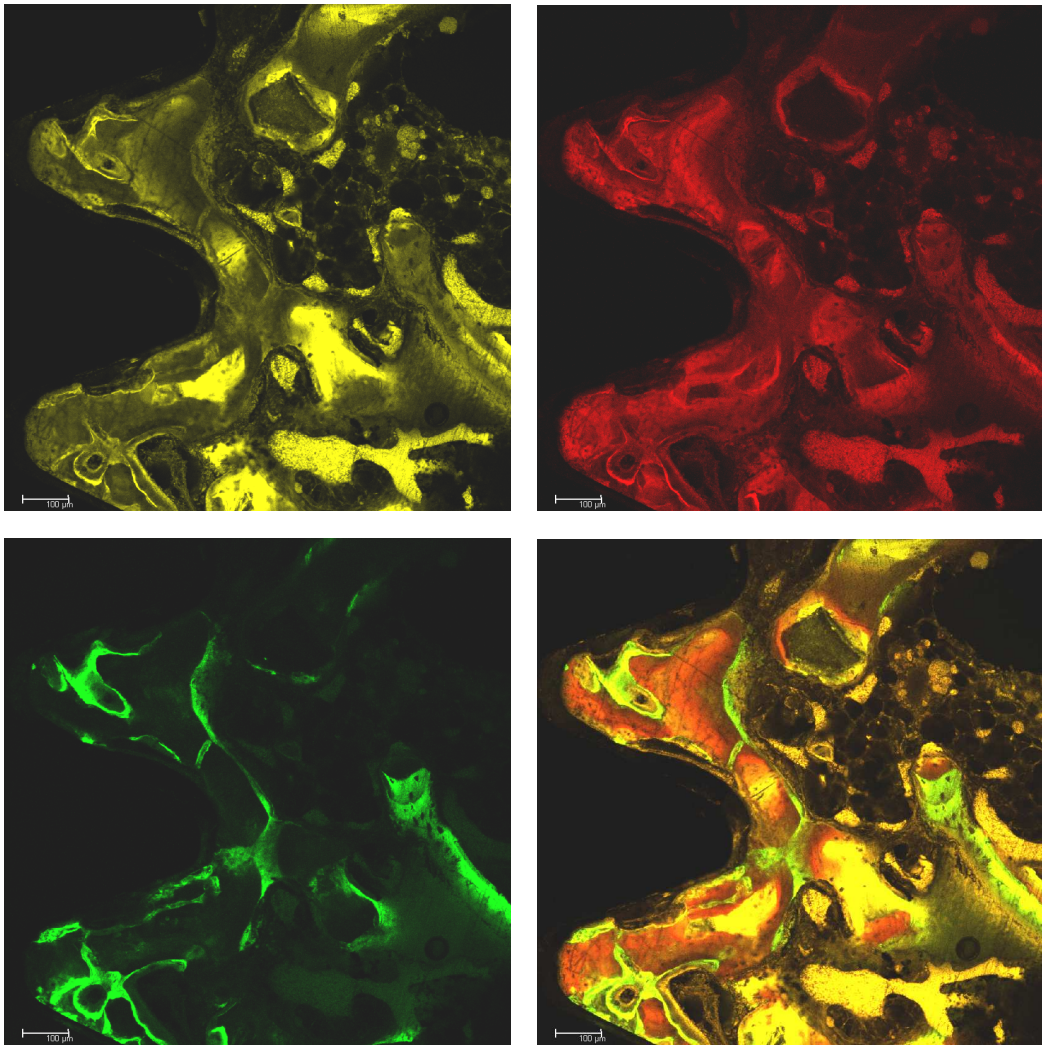
7 dias após (Figuras 59 e 63), marcação com alizarina (em vermelho) que foi inoculada 14 e 21 dias após (Figuras 60 e 64) e marcação com calceína (em verde), inoculada após 45 e 52 dias (Figuras 61 e 65).

No grupo controle foi observado marcação para tetraciclina no terço apical de 13,56%, para alizarina de 19,15% e de calceina 13,27%. No terço médio houve marcação de 14,26% de tetraciclina, 29,85% de alizarina e 14,27% de calceína. Já no terço cervical, houve marcação de tetraciclina de 14,82%, de alizarina 26,63% e de calceína 8,91%.



Figuras 59, 60, 61 e 62 – Grupo Controle período de 2 meses da tetraciclina, alizarina, calceína e em overlay, coloração amarela significa tetraciclina, vermelha alizarina e verde a calceína. Na overlay, pode ser vista as três marcações separadamente

No grupo experimental foi observada marcação para tetraciclina no terço apical de 14,22%, para alizarina de 30,94% e para calceína de 4,63% da área. No terço médio houve marcação de 16,01% de tetraciclina, 21,24% de alizarina e 4,05% de calceína. Já no terço cervical, houve marcação de tetraciclina de 14,69%, para alizarina de 24,08% e para calceína de 5,09%.

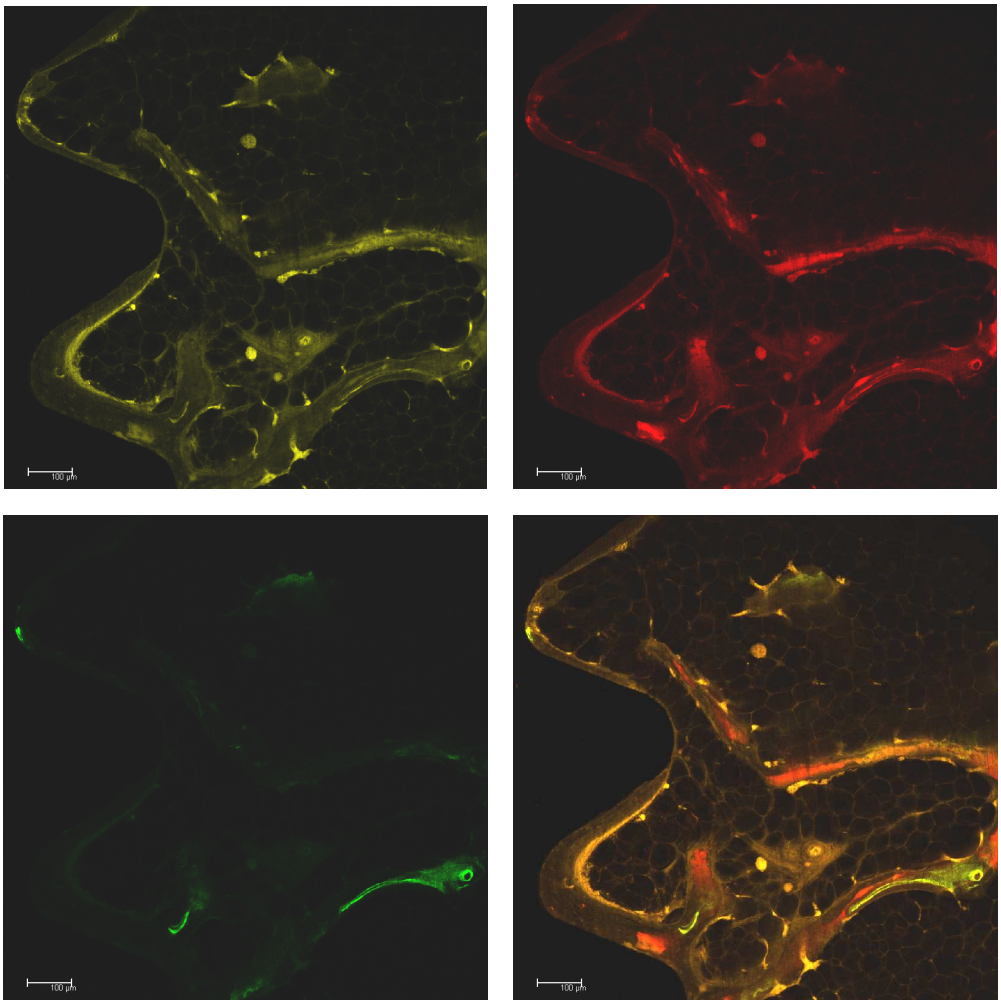


Figuras 63, 64, 65 e 66 – Grupo Experimental período de 2 meses da tetraciclina, alizarina, calceína e em overlay, coloração amarela significa tetraciclina, vermelha alizarina e verde a calceína. Na overlay, pode ser vista as três marcações separadamente

5.7.4.4 Período de 6 Meses

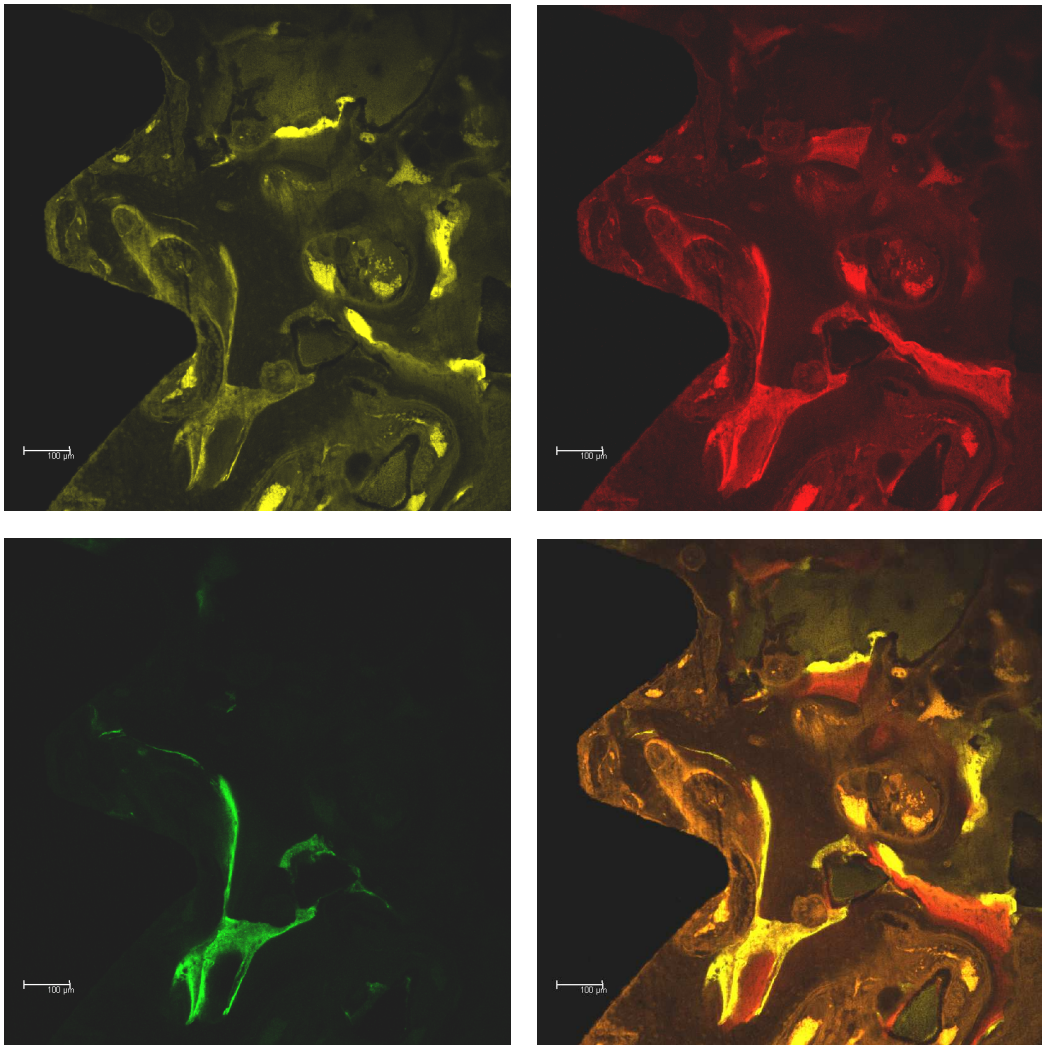
No período de 6 meses após a colocação do implante, foram observadas marcações de tetraciclina (Figuras 67 e 71) que foram inoculadas logo após a cirurgia e 7 dias após (em amarelo) marcação com alizarina (Figuras 68 e 72) que foi inoculada 14 e 21 dias após (em vermelho) e marcação com calceína (Figuras 69 e 73) (em verde), inoculada após 45 e 52 dias.

No grupo controle foi observado marcação para tetraciclina no terço apical de 5,75%, para alizarina de 9,85% e para calceína 3,60% da área. No terço médio houve marcação de 4,77% de tetraciclina, 7,89% de alizarina e 4,57% de calceína. Já no terço cervical, houve marcação de tetraciclina de 8,60%, de alizarina 13,91% e de calceína 5,87%.



Figuras 67, 68, 69 e 70 – Grupo Controle período de 6 meses da tetraciclina, alizarina, calceina e em overlay, coloração amarela significa tetraciclina, vermelha alizarina e verde a calceína. Na overlay, pode ser vista as três marcações separadamente

No grupo experimental foi observada marcação para tetraciclina no terço apical de 9,93%, para alizarina de 10,21% e para calceína de 0,86% da área. No terço médio houve marcação de 11,76% de tetraciclina, 11,72% de alizarina e 8,15% de calceína. Já no terço cervical, houve marcação de tetraciclina de 10,63%, de alizarina 13,70% e de calceína 2,11%.



Figuras 71, 72, 73 e 74 – Grupo Experimental período de 6 meses da tetraciclina, alizarina, calceina e em overlay, coloração amarela significa tetraciclina, vermelha alizarina e verde a calceína. Na overlay, houve sobreposição da tetraciclina e calceina

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 SOBRE A METODOLOGIA APLICADA

6.1.1 Sobre o modelo experimental utilizado

O coelho é um animal já consagrado como modelo experimental para análise de implantes osteointegrados (ZAFFE et al., 2001; CORDIOLI et al., 2003; LILJENSTEN et al., 1998; SAWAI et al., 1998; KUDO et al, 2001; LU e RABIE, 2003; FISHER et al, 2004; CORDIOLI et al., 2003; MOHAMMADI et al., 2000; KOO et al., 2004; SAKAKURA et al., 2003).

Porém, o sitio de implantação mais utilizado é a tíbia (ZAFFE et al., 2001; KOO et al., 2004; SAKAKURA et al., 2003). A mandíbula já foi utilizada algumas vezes como modelo experimental de reparo alveolar (CAO et al., 2001), materiais de enxerto (CORDIOLI et al., 2003; LILJENSTEN et al., 1998; SAWAI et al., 1998, KUDO et al., 2001, LU e RABIE, 2003; FISHER et al., 2004) e para avaliação de osteointegração de implantes (CORDIOLI et al., 2003; LILJENSTEN et al., 1998; SAWAI et al., 1998; MOHAMMADI et al., 2000).

A escolha da mandíbula como sitio foi devido à semelhança do tipo ósseo encontrado na mandíbula humana e ainda a tentativa de reproduzir as inerentes interferências que o ambiente bucal pode trazer no reparo e osteointegração, como a presença de mucosa recobrindo a área ao invés de pele, contato com alimentos, saliva e os microorganismos bucais.

Apesar do inconveniente da limitação de abertura bucal para os procedimentos cirúrgicos, dificuldade de alimentação dos animais, sendo necessária administração de soro glicosado endovenoso no pós-operatório e a possibilidade de aspiração de coagulo que pode levar a morte, pode-se inferir que o modelo experimental aplicado é eficiente e aceitável.

6.1.2 Sobre os métodos de avaliação empregados

Diversos autores estabeleceram parâmetros para análise da osteointegração dos implantes e dentre eles estão o radiográfico, o biomecânico e microscópico.

A análise radiográfica é o método mais utilizado clinicamente devido à impossibilidade de avaliação biomecânica com torque de remoção e microscópica (só é possível uma análise inicial de torque de travamento com torquímetro manual).

Quanto à avaliação radiográfica, são propostos como indicadores de sucesso do implante: ausência de área radiolúcida continua ao redor do implante (BUSER et al., 1990, ONG et al., 2008) e perda anual da altura óssea ao redor do implante não maior que valores entre 0,9 e 1,6 mm durante o primeiro ano e de 0,2mm nos anos seguintes pós-implantação (BRAGGER, 1994; ONG et al., 2008, ALBREKTSSON et al., 1986; ALBREKTSSON e ISIDOR, 1994).

A medida da perda anual da altura óssea é dada por medidas entre a crista óssea alveolar e a plataforma do implante, método utilizado neste trabalho. Este método já difundido como parâmetro de analise periodontal foi trazido para a Implantodontia (SUNITHA et al., 2008; BLANES et al., 2007; HATLEY et al., 2001; BRAGGER, 1994; NORTON e WILSON, 2002).

Já a densidade óssea (valores de pixel) é constantemente utilizada para análise de reparo ósseo e foi trazida para a Implantodontia, pois permite a avaliação da qualidade e da quantidade de deposição de osso ao redor ao longo dos períodos analisado (BRAGGER, 1994; HATLEY et al., 2001).

Sobre o uso de testes biomecânicos ou torque de remoção, este é utilizado para avaliar a osteointegração porque a resistência encontrada para a remoção de um implante está relacionada ao grau de contato entre o osso e as irregularidades da superfície do implante (SENNERBY, THOMSEN e ERIKSON, 1992; CARLSSOM et al., 1992, BUTCHER et al., 2006). Portanto, o torque de remoção de um implante é influenciado pelas propriedades mecânicas do osso adjacente (qualidade e quantidade) e também pelo índice de contato entre osso e implante (SENNERBY, THOMSEN e ERIKSON, 1992; IVANOFF, SENNERBY e LEKHOLM, 1996; SAKAKURA et al., 2003; BRANEMARK e SKALAK 1998; LOURENÇO JUNIOR, 2002; JOHANSSON e ALBREKTSON, 1987).

Outra análise muito importante e utilizada neste estudo é a microscópica, onde se pode observar a osteointegração em si, que, conforme já citado, é a interação direta do osso com a superfície do implante.

Um dos critérios mais utilizados para essa análise é proporção de osso em contato direto com o implante (BIC) que é dada pela porcentagem de osso encontrado em contato com a superfície do implante (BUTCHER et al., 2006, BRANEMARK et al., 1997, BRANEMARK et al., 1998; JUNG et al., 2008; DE MAEZTU et al., 2008; RAHMANI et al., 2005; LOURENÇO, 2002; THERHEYDEN et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007, YOU et al., 2007).

Como o objetivo desse trabalho foi avaliar o tecido ósseo associado ao biomaterial frente à superfície de implantes, interferências externas sobre o terço cervical foram eliminadas, utilizando-se apenas 3 roscas apicais para análise do percentual de osteointegração, metodologia semelhante a de Lourenço, em 2002.

Outra análise é proporção da área de osso presente na região próxima às roscas, também chamada de volume ósseo percentual, que é dada em porcentagem com relação à área total analisada (BRANEMARK et al., 1997; BRANEMARK et al., 1998; LOURENÇO, 2002; THERHEYDEN et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007).

Já a utilização de marcadores de neoformação óssea para análise na microscopia confocal a laser, outra análise utilizada neste trabalho, vem sendo difundida, pois permite avaliar a quantidade de deposição óssea em cada período de inoculação e comparar entre os grupos. Com esses marcadores, através de softwares de análise de imagens pode-se fazer uma analise morfométrica da porcentagem de osso depositado nos períodos marcados (KOO et al., 2004; YOSHIMOTO et al., 2004), tendo assim, uma análise mais apurada do reparo e do processo de osteointegração do implante.

6.2 SOBRE OS RESULTADOS OBTIDOS

6.2.1 Análise biomecânica

A partir do estudo de Johansson e Albrektson em 1987 em coelhos, pode-se inferir que os torques necessários para a remoção dos implantes após 3 semanas, 1, 3, 6 e 12 meses foram de 10, 16.8, 68, 77.6, e 88 Ncm respectivamente.

Nesse estudo obteve-se para o período de 2 meses, valores de 19Ncm para o grupo controle, compatível com valores entre 1 e 3 meses (16,8 e 68Ncm) de Johansson e Albrektson, porem no grupo experimental, esses valores foram bem menores (4,35Ncm).

Já no período de 6 meses, obteve-se valor de 15,75Ncm no grupo controle e 14,75Ncm no experimental, valores também bem abaixo do descrito acima (77,6Ncm).

Os resultados também foram abaixo dos de Sakakura et al., em 2003, que fez testes após 12 meses com valores de 39,2Ncm no grupo controle e 28,5Ncm no grupo com uso de ciclosporina, porem como o período avaliado foi mais longo, não há possibilidade de uma comparação.

Em um trabalho comparando implantes inseridos mono e bicorticalmente, Ivanoff, Sennerby e Lekholm, em 1996, encontraram valores de 13,2 Ncm após 6 semanas e de 15,5 Ncm no grupo monocortical, semelhante ao trabalho aqui apresentado, mostrando valores semelhantes ao nosso grupo controle que foi de 19 Ncm após 8 semanas.

Talvez o que tenha levado a esse valor médio baixo nos resultados foi que houve uma variação muito grande entre os animais. Alguns estavam osteointegrados e outros fibrointegrados, levando a um valor de torque de remoção de zero, diminuindo a média geral. Também pode ser explicado pelo n baixo de 4 animais que ocorreu devido a perda de muitos animais quem contraíram uma infecção por *Pasteurella*, que levou a doenças respiratórias e pneumonia aguda, fator que não foi citado anteriormente.

Outro fator é de o implante ter sido instalado monicorticalmente devido à anatomia do modelo experimental, pois quando comparado aos resultados do grupo monicortical de Ivanoff, Sennerby e Lekholm, em 1996 os resultados são semelhantes.

6.2.2 Análise radiográfica

Conforme já citado acima, foram propostos como critérios para avaliação radiográfica de sucesso do implante: ausência de área radiolúcida continua ao redor do implante (BUSER et al., 1990; ONG et al., 2008) e perda anual da altura óssea ao redor do implante não maior que valores entre 0,9 e 1,6 durante o primeiro ano e de 0,2mm nos anos seguintes pós-implantação (BRAGGER, 1994; ONG et al., 2008, ALBREKTSSON et al., 1986; ALBREKTSSON e ISIDOR, 1994).

Nesse estudo, o grupo controle apresentou uma perda de 1,38 após 1 mês, 0,22 após 2 meses e 1,01 após 6 meses. Lembrando-se que os valores correspondem a animais diferentes em cada período, o valor de perda está dentro do aceitável nos períodos analisados.

Hatley et al., em 2001, testaram a influencia da distancia entre os implantes instalados e tiveram resultados semelhantes ao presente estudo após 3 meses, com perda de 1,3 no grupo com implantes instalados a 1mm de distancia, 1,0 para os instalados com 1,5mm de distancia e 0.8 para os instalados com 3mm de distancia.

Não houve diferenças na medida da distancia da crista óssea a plataforma do implante ao longo do tempo analisado e nem entre os grupos controle e experimental, mostrando que o material de enxerto não altera a altura da crista óssea ao redor do implante.

No que diz respeito à densidade radiográfica houve diferença entre o grupo controle e experimental, assim como no estudo anterior em alvéolos de terceiros molares (MUNHOZ et al., 2006), o que pode ser atribuído ao conteúdo inorgânico do material de enxerto. Apenas com períodos mais longos, com 2 ou mais anos, após reabsorção do material de enxerto, poderíamos saber se essa diferença permaneceria.

6.2.3 Análise de contato osso implante (BIC)

6.2.3.1 Grupo desmineralizados após teste de torque

Poucos trabalhos têm sido encontrados na literatura recente com esse tipo de processamento, onde há desmineralização das peças após teste biomecânico (com remoção do implante).

Os valores médios de BIC nesse grupo foram menores que os encontrados no sistema Exakt, talvez porque durante o torque de remoção, áreas de osso que estariam em contato com a superfície do implante tenham sido removidas junto com o implante.

Foram encontrados valores médios de BIC de 44,48% no grupo controle e 39,35% do grupo experimental após 2 meses e de 46,8% para o grupo controle e 52,95% para o grupo experimental após 6 meses.

Esses valores são semelhantes aos encontrados após 4 meses por Ponzoni em 2004, onde foi estudado uso de implantes com superfície jateada implantados imediatamente pós-extração em cães (57,9%), utilizando-se os critérios de Lourenço, 2002, para a análise.

Coelho et al., em 2008 estudando implantes convencionais e os do tipo biocerâmicos, utilizando metodologia semelhante, analisou BIC após o teste biomecânico e encontrou, após 2 semanas, valores médios de 72,66% para o grupo controle e 69,44% para o grupo experimental e, após 4 semanas, 70,44% no grupo controle e 69,11% no grupo experimental, valores um pouco acima dos encontrados no presente trabalho.

6.2.3.2 Grupo do sistema Exakt

O índice de contato osso-implante conhecido pela sigla BIC que é dada pela porcentagem de osso encontrado diretamente sobre o implante comparada a superfície total analisada, geralmente dado por medidas realizadas nas 3 a 5 roscas

mais apicais, bilateralmente (BUTCHER et al., 2006; BRANEMARK et al., 1997; BRANEMARK et al., 1998; JUNG et al., 2008; DE MAEZTU et al., 2008; RAHMANI et al., 2005; LOURENÇO JUNIOR, 1998; THERHEYDEN et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007; YOU et al., 2007).

Em um trabalho comparando implantes instalados mono e bicorticalmente, Ivanoff, Sennerby e Lekholm em 1996 encontraram valores de 793.3 µm após 6 semanas e de 1136.2 µm no grupo monocortical. Esses valores foram menores que os encontrados após 4 semanas nesse estudo de 1955,90 µm para o grupo controle e de 1863,13 µm no grupo experimental, mas como essa medida em µm depende do numero de roscas e a anatomia delas e o autor não analisou valores percentuais, fica difícil fazer uma análise comparativa com o presente trabalho.

Sawai, Niimi e Johanson, em 1998, estudaram o uso de câmera hiperbárica em enxertos autógenos e implantes em coelhos após 20, 30, 60, 90 e 120 dias através de análise microscópicas citadas acima e observou, no grupo controle, um valor de BIC de 3,7,10,15 e 27% e de 3, 17, 18, 23 e 38% no grupo com câmera hiperbárica (grupo experimental), nos períodos citados. Esses valores foram inferiores aos encontrados em nosso estudo em ambos os grupos que foram de 58.18 e 70.31 nos grupos controle e experimental após 30 dias, 73.75 e 69.98 após 60 dias e 69.43 e 65.46 após 180 dias.

Cordioli et al., em 2003 analisaram o transplante de osso com implante e obteve como resultado de índice de BIC após 3 meses nos animais osteointegrados 39%, valores também abaixo dos obtidos neste estudo.

Em um outro estudo de 2003, Veis et al., compararam implantes convencionais e Osseotite em cães e encontraram, após 5 meses, valores de 46,44% no grupo Osseitite e 28,59% no grupo de implante convencional, valores abaixo dos obtidos neste estudo.

Seguindo metodologia semelhante, Nikolidakis et al., num estudo recente compararam implantes puros e associados a fatores de crescimento TGF-β1 em diferentes quantidades (0,5 e 1 µg) e após 6 semanas observaram uma média de valores de BIC significantemente menor nos grupos experimentais (56% no grupo controle e 48 e 45% dos grupos com 0,5 e 1 µg respectivamente), valores também abaixo do encontrados em nossos grupos controle e experimentais com 4 semanas.

Existem poucos estudos utilizando materiais de enxerto em contato com implante de titânio. A seguir, serão citados os que utilizaram o BioOss, material semelhante ao Genox inorgânico, utilizado nesse estudo.

Therheyden et al., em 1999 compararam o uso de BMP associado ao BioOss em levantamento de seio em minipigs e observaram, após 6 meses, valores de 80% de BIC no grupo experimental e 38,6% no grupo controle. Comparando-se ao nosso presente estudo, com 6 meses, os valores do grupo experimental deles ficou acima do nosso, que foi de 65,46%, porem o grupo controle possuiu resultados bem abaixo dos encontrados no nosso grupo controle de 69,43%.

Utilizando BioOss em levantamento de seio em coelhos, Rahmani et al., em 2005 comparam com grupo controle sem nenhum tipo de enxerto e após 2, 4, 6 e 8 semanas. Através de analise de regressão os autores concluíram que não houve diferenças ao longo do tempo. As medidas de valores de BIC foram de 22,8% no grupo controle e 23,7% no grupo experimental, valores abaixo dos encontrados nesse presente estudo.

De Vicente et al., em 2006, num estudo em cães compararam o uso de BioOss, osso alógeno e grupo controle com ou sem uso de membrana e obteve, após 9 meses os seguintes valores de BIC: no lado sem membrana 7,5% no grupo controle, 29% no grupo de enxerto alógeno e 36% no grupo BioOss. Já no lado com membrana os valores foram de 9,3% no grupo controle, 35,3% no grupo alógeno e 75,6% no grupo BioOss. Com exceção do grupo BioOss com membrana que teve valor semelhante ao nosso grupo experimental, os outros valores foram menores que os encontrados neste presente estudo após um período até menor, de 6 meses.

Com uma metodologia bastante semelhante utilizando um defeito preenchido com BioOss e outro de BioOss mais PRP (plasma rico em plaqueta) em cachorros, You, Choi e Li et el., em 2007 obteve após 4 meses uma média de 60,1% de BIC no grupo com BioOss e 30,8% no grupo de BioOss associado ao PRP. Comparando-se o grupo com BioOss e o grupo experimental do presente estudo, onde utilizou-se o Geno-ox, material bastante semelhante observamos um índice de BIC de 69,98% após 2 meses e 65,46% após 6 meses, ou seja, valores semelhantes aos encontrados por esses autores.

Schwarz et al., também em 2007 com metodologia semelhante, mas em cães compararam o uso de fosfato beta tricalcico (Bone Ceramic®) e BioOss associados a implantes e obtiveram após 1, 4 e 9 semanas BIC de 2.3%, 36.3% e 61.8% para o grupo de fosfato e para o grupo de BioOss de 4.3%, 42.3% e 54%. Os valores do grupo BioOss de 42.3% comparados ao experimental do nosso estudo após 4 semanas (69,98%) foi relativamente mais baixo.

Posteriormente, em 2008, Schwarz et al., realizaram defeitos de 4mm de altura na região da crista óssea numa das paredes ao redor do implante e preencheram com BioOss e 6 diferentes tipos de membrana, comparando ao lado controle, sem nenhum tratamento. Foram encontrados após 1 semana valores de BIC de 0 para todos os grupos, inferior a este trabalho. Após 4 semanas foram encontrados valores de 39% para grupo controle e de 31.3, 30.5, 24.7, 10.5, 48.5 e 28% nos grupos experimentais, valores abaixo dos encontrados nesse mesmo período no presente estudo (58,18% no grupo controle e 70,91% no grupo experimental). No período de 9 semanas, foram encontrados para o grupo controle 63,5% de BIC e nos grupos experimentais 61, 66, 41.5, 66.5, 63.5 e 27, valores em média semelhantes ou um pouco abaixo aos encontrados no presente estudo, após 8 semanas (73,75 para grupo controle e 69,98 para grupo experimental).

De acordo com observações dos testes estatísticos, neste estudo mostrou-se que houve diferença apenas no grupo controle entre os períodos de 0 Hora e 2 e 6 meses.

Comparando-se os grupos nos períodos separadamente, houve diferenças entre grupos apenas no período de zero hora, onde o BIC foi maior no grupo experimental, devido talvez a uma maior resistência no momento da colocação do implante, que também foi observado clinicamente.

Não houve diferenças entre os grupos controle e experimental nos períodos de 1, 2 e 6 meses e, observando comparativamente aos resultados obtidos por outros autores, com metodologia semelhantes, pode-se inferir que o uso do Genox inorgânico associado a implantes de titânio teve um comportamento aceitável microscopicamente, no que diz respeito ao contato direto entre osso e implante.

6.2.4 Análise de área de osso no sistema Exakt

Outra análise bastante utilizada microscopicamente é proporção da área de osso presente na região próxima às roscas, também chamada de volume ósseo percentual, que é dada em porcentagem com relação à área total analisada (BRANEMARK et al., 1997, BRANEMARK et al., 1998, LOURENÇO JUNIOR, 1998, THERHEYDEN et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007).

Em um trabalho comparando implantes inseridos mono e bicorticalmente, Ivanoff, Sennerby e Lekholm, em 1996, encontraram no grupo monocortical valores de 329121,3 μm^2 após 6 semanas e de 323 896,5 μm^2 após 12 semanas, valores esses um pouco maiores que os encontrados nesse estudo (251771 μm^2 no grupo controle e de 255538,4 μm^2 no grupo experimental).

Sawai et al., em 1998 estudaram o uso de câmera hiperbárica em enxertos autógenos e implantes em coelhos após 20, 30, 60, 90 e 120 dias obtendo valores de área de osso de 23, 33, 52, 60 e 68% no grupo controle e de 31, 48, 66, 67 e 72% no grupo experimental. Os resultados após 30 e 60 dias em ambos os grupos foram semelhantes aos encontrados em nosso estudo (43,72% para grupo controle e 53,63% para experimental após 30 dias e 54,94% para grupo controle e 55,43% para experimental após 60 dias).

Outro trabalho, de Cordioli et al., em 2003, utilizaram esse método para analisar transplante de osso com implante. Nos implantes osteointegrados após 3 meses, encontrou valores médios de 44% de área de osso, resultado esse semelhante aos encontrados em ambos os grupos após 2 meses (54,94 para controle e 55,43% para experimental)

Seguindo metodologia semelhante a este trabalho, Nikolidakis et al., num estudo recente, comparou implantes puros e associados a fatores de crescimento TGF-β1 em diferentes quantidades (0,5 e 1 µg) e, após 6 semanas, não houve diferença entre os grupos com relação a área de osso (68% no grupo controle e 65 e 66% nos grupos com 0,5 e 1 µg respectivamente), resultados semelhantes aos encontrados após 4 e 24 semanas em nossos grupos controle (54,94 e 62,96%) e experimental (55,43 e 50,62%).

Schwarz et al., 2007 também em 2007 em cães comparou o uso de fosfato beta tricalcico (Bone Ceramic®) e BioOss associados a implantes e obtiveram após 1, 4 e 9 semanas além do BIC citado anteriormente, uma área de osso de 0.03%, 2.9% e 19.9% para o grupo de fosfato e para o grupo de BioOss, de 0.02%, 18.9% e 22.3%. Os valores do grupo BioOss de 18,9% comparados ao experimental do nosso estudo após 4 semanas (55,43%) foi relativamente mais baixo.

Observando-se comparações estatísticas neste estudo, não houve diferenças entre os grupos controle e experimental e o volume ósseo encontrado em ambos os grupos correspondem aos encontrados na literatura, mostrando um comportamento aceitável do uso do GenOx associado a implantes.

A maioria dos trabalhos utiliza a metodologia do sistema Exakt, por isso os dados comparados acima foram os de área óssea dos grupos processados com a mesma metodologia. Não foram encontrados dados de volume de área óssea percentual utilizando-se o método de desmineralização das peças.

6.2.5 Análise da microscopia confocal

O método de microscópio confocal laser scanning tem sido utilizado para visualizar deposição de tetraciclina, calceína e alizarina em faixas de osso de espécimes não-desmineralizados, permitindo a visualização de deposição óssea caracterizada morfologicamente (NISHIKAWA et al., 2006; SUZUKI, AOKI e OHYA, 1997).

Com esses marcadores, através de softwares de análise de imagens pode-se fazer uma analise morfométrica da porcentagem de osso depositado nos períodos marcados (KOO et al., 2004), tendo uma análise mais apurada do reparo e do processo de osteointegração do implante, o que o torna de extrema importância.

YOSHIMOTO et al., em 2004, estudaram dois diferentes tipos de implante, sendo um convencional e outro com oxido de alumínio e obteve médias de marcação em micrometros para as faixas dos marcadores. Para o grupo convencional houve marcação de uma média de 210,36 µm para alizarina, 60,16 µm para calceína e 21,99 µm para tetraciclina. Já no grupo com oxido de alumínio

marcou-se 263,32 µm de alizarina, 108,79 µm de calceína e 81,35 µm de tetraciclina, mostrando uma deposição significantemente mais marcante neste grupo. Esses resultados não podem ser comparados aos nossos porque foram dados em medidas de espessura das faixas de marcação, e não contada a marcação como um todo.

Balatsouka et al., num estudo de 2005, em tíbia de coelhos, analisou a porcentagem de marcação em microscópio confocal inoculando calceína após 7 dias e a alizarina após 21 dias. Após 15 e 30 dias, os animais foram eutanasiados. Os resultados encontrados foram de 20,5% de neoformação após 15 dias, o que é semelhante ao resultado de tetraciclina apresentado em nosso trabalho, que obteve uma media de 32,7% nos três terços após 4 semanas. Após 30 dias houve deposição de 32,7%, valores acima do resultado de alizarina apresentado em nosso trabalho, com média de 23% nos 3 terços no grupo controle.

Papalexiou et al., em 2004 utilizando cães com doença periodontal induzida, testaram dois tipos de implantes (com superfície experimental e com jato de titânio). Os marcadores tetraciclina foram inoculados após 3 e 56 dias, calceína após 28 dias e alizarina 3 dias após a eutanásia que foi realizada após 84 dias (3 meses). Os resultados obtidos para deposição óssea foram de: 5.28% após 3 dias, 10.3% após 28 dias, 21.14% após 56 dias e 6.98% pós 84 dias no grupo de superfície experimental e de 3.36% após 3 dias, 9.58% após 28 dias, 14.57% após 56 dias e 7.08% após 84 dias no grupo controle.

No período de 3 dias os resultados foram inferiores aos obtidos com tetraciclina deste trabalho (após 7 dias), que foi uma média de 13,83% para o grupo controle em todos os períodos e terços e de 16,98% para o grupo experimental em todos os períodos e terços também. No período de 28 dias os resultados foram abaixo dos encontrados nas marcações por alizarina que foram de 19,59% para o grupo controle em todos os períodos e terços e de 18,74% para o grupo experimental em todos os períodos e terços também.

Porem, os valores obtidos após 56 dias foram acima dos encontrados nas marcações por calceína após 45 dias que foram de 7,92% para o grupo controle em todos os períodos e terços e de 4,63% para o grupo experimental em todos os períodos e terços também.

Em 2006, Lan et al., estudaram a influencia do uso de ácido polilático puro (Grupo IV) ou associado à BMP e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (Grupo I), BMP e fator de crescimento semelhante a insulina (GrupoII) ou associado apenas a BMP (Grupo III), recobrindo os implantes instalados em fêmur de coelhos, inoculados com calceína 4 semanas após a colocação dos implantes e com alizarina 8 semanas após. Os animais foram eutanasiados 12 semanas após. Foi obtida uma marcação de calceína de 7.01%, 7.55%, 6.22% e 4.94 %, de alizarina de 10.01%, 9.89%, 7.97% e 5.98% para os Grupos I, II, III e IV respectivamente.

Se observados os valores de 4 semanas (28 dias), eles são menores que os encontrados com a marcação de alizarina do nosso estudo (inoculada com 14 e 21 dias) em ambos os grupos, porém os valores após 8 semanas (56 dias) quando comparadas aos valores de calceína (inoculada com 45 e 52 dias) no presente estudo são semelhantes.

Um ano após, em 2007, Lan et al., estudaram apenas a influência da BMP recobrindo superfície de implantes comparando com grupo controle, apenas recoberto com acido polilático em fêmur de coelhos. Os marcadores calceína e alizarina foram inoculados após 4 e 8 semanas e os animais foram eutanasiados após 12 semanas. Foi obtida uma porcentagem de marcação de calceína de 7 % para o grupo experimental e 5% para o grupo controle e de alizarina de 8% para o grupo experimental e 6% para o grupo controle. Assim, como no estudo anterior, se observados os valores de 4 semanas (28 dias), eles são menores que os encontrados com a marcação de alizarina do nosso estudo (inoculada com 14 e 21 dias) em ambos os grupos, porém os valores após 8 semanas (56 dias) quando comparadas aos valores após 45 e 52 dias no presente estudo são semelhantes.

Em nosso estudo, não se observou nenhuma diferença entre os grupos controle e experimental nas marcações por tetraciclina, alizarina e calceína nos períodos analisados, apenas pequenas variações com relação ao terços nos períodos iniciais (0 hora e 1 mês) para tetraciclina e um aumento ao longo do tempo (entre 0 hora e 6 meses e 1 mês e 6 meses para tetraciclina, 1 mês e 6 meses e 2 meses e 6 meses para alizarina).

Observou-se também uma marcação mais fraca nos grupos de 2 e 6 meses em ambos os grupos controle e experimental para o marcador tetraciclina,

provavelmente pelo maior período após a inoculação, pode ter havido uma remodelação óssea e a marcação foi perdida.

Comparando com a literatura os valores obtidos foram muitas vezes semelhantes e algumas vezes até maiores que os encontrados, mostrando uma boa quantidade de deposição óssea nos períodos inoculados nesse modelo experimental. Como não houve diferenças significantes entre os grupos, pode-se inferir que o Genox inorgânico teve um comportamento semelhante ao lado controle, podendo ser utilizado em alvéolos dentários.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o enxerto de osso bovino inorgânico (Gen-Ox inorgânico®) em alvéolos de incisivos inferiores de coelhos associado a implantes teve um comportamento aceitável com relação à osteointegração através de análises radiográfica, biomecanica e histomorfométrica convencional, do sistema Ekaxt e confocal a laser.

Porem, estudos clínicos e associação de carga mastigatória são necessários para avaliar melhor o comportamento deste material.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aaboe M, Schou S, Hjørting-Hansen E, Helbo M, Vikjær D. Osseointeration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes. Clin Oral Impl Res. 2000;11: 51–58.

Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang, N P & Karring, T (eds). Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology, pp. 365–369. London: Quintessence Publishing Co. Ltd 1994.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington, P & Eriksson, A R. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants. 1986; 1: 11–25.

Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. Periodontol. 2000, 1994; 4:58–73.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorphometric evaluations at 9 months. J Periodontol. 2000; 71(6):1015-1023.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 2: Histochemical observations at 9 months. J Periodontol. 2001;72(2):152-159.

Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. An experimental study in rabbits. Clin Oral Impl Res. 2005;16:268–276.

Blanes RJ, Bernard JP, Blanes ZM, Belser UC. A 10-year prospective study of ITI dental implants placed in the posterior region. I: Clinical and radiographic results. Clin Oral Impl. Res. 2007;18: 699–706.

Bragger U. Radiographic parameters for the evaluation of peri-implant tissues. Periodontol. 2000, 1994; 4:87-97.

Bränemark R, Öjhmell LO, Nilsson P, Thornsen P. Biomechanical characterization of osseointegration during healing: an experimental in tivo study in the rat. Biomaterials.1997; 18:969-978.

Brånemark R, Ohrnell LO, Skalak R, Carlsson L, Brånemark PI. Biomechanical characterization of osseointegration: an experimental in vivo investigation in the beagle dog. J Orthop Res. 1998; 16(1):61-69.

Brånemark R, Skalak R. An in-vivo method for biomechanical characterization of bone-anchored implants. Med Eng Phys. 1998; 20(3):216-219.

Büchter A, Joos U, Wiesmann HP, Seper L, Meyer U. Biological and biomechanical evaluation of interface reaction at conical screw-type implants Head & Face. Medicine. 2006; 21;2(1):5.

Buser D, Weber HP, Lang NP. Tissue integration of non-submerged implants. 1-year results of a prospective study with 100 ITI hollow-cylinder and hollowscrew implants. Clinical Oral Implants Research. 1990; 1:33–40.

Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. Pesqui Odontol Brás. 2001; 15(3):257-262.

Camargo PM, Lekovik V, Weinlaender M, Klollevold R, Kenney EB, Dimitrijevic B, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 2000; 90(5): 581-586.

Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi K. Bone mineral density in mandibles of ovarectomized rabbits. Clin Oral Implan Res. 2001; 12:604-608.

Carlssom L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rought titanium implants. Int J Oral Maxillofac Impl. 1988; 3: 21-24.

Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. Clin Oral Impl Res 2003. 14(2):137-143.

Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study in dogs J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 2009; 88: 387–393.

Cordioli G, Atiyeh F, Piattelli A, Majzoub Z. Healing of transplanted composite bone grafts–implants: a pilot animal study. Clin Oral Implan Res. 2003; 14: 750-758.

De Maeztu MA, Braceras I, Alava JI, Gay-Escoda C. Improvement of osseointegration of titanium dental implant surfaces modified with CO ions: a comparative histomorphometric study in beagle dogs. Int J Oral Maxillofac Surg. 2008; 37: 441–447.

De Vicente JC, Recio O, Martín-Villa L, Junquera LM, López-Arranz JS. Histomorphometric evaluation of guided bone regeneration around implants with SLA surface: an experimental study in beagle dogs. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006; 35: 1047–1053.

Fisher JP, Lalani Z, Bossano CM, Brey EM, Demian N, Johnston CM, et al. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. J Biomed Mater Res A. 2004; 68(3):428-438.

Garcia RR, Barbosa JR. Histologic study of a bovine desmineralized bone matrix on bone repair process in rabbits calvaria. Indian J Dent Res. 2000; 11(4):131-138.

GENIUS – DIVISÃO BAUMER S.A. Gen-Ox - Osso bovino inorgânico liofilizado RMS: 103.455.00001. Disponível na Internet. http://www.genius.ind.br 24. ago. 2005.

Gregori C. Cirurgia odontológica para o clínico geral. 1ed. São Paulo, Sarvier, 1988

Hansson HA, Alberktsson T, Branemark PI. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. J Prosthet Dent. 1983;50:108–113.

Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. Clin Oral Implan Res. 2004;15: 339-345.

Hatley CL, Cameron SM, Cuenin MF, Parker MH, Thompson SH, Harvey SB. The Effect of Dental Implant Spacing on Peri-implant Bone Using the Rabbit (Oryctolagus cuniculus) Tibia Model. J Prosth. 2001; 10:154-159.

Hirota L, Rezende MLR, Granjeiro JM. Avaliação clínica e histológica de uma associação de biomateriais (Gen-Tech) em levantamento de seios maxilares. Encontro Científico de Pós-Graduação HRAC-USP. 2003;5:42.

Indovina Jr A, Michael SB. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. J Oral Maxillofac Surg. 2002;60(1):53-58.

Ivanoff CJ, Sennerby L, Lekholm U. Influence of mono and bicortical anchorage on the integration of titanium implants A study in rabbit tibia. Int J Oral Maxillofac Surg. 1996; 25: 229-235.

Johansson C, Albrektsson T. Integration of srew implants in the rabbit. A one-year follow-up of renmoval torque of titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 1987; 2(2): 69-73.

Jung BA, Yildizhan F, Wehrbein H. Bone-to-implant contact of orthodontic implants in humans – a histomorphometric investigation. European Journal of Orthodontics. 2008; 30:552–557.

Kim DM, Badovinac RL, Lorenz RL, Fiorellini JP, Weber HP. A 10-year prospective clinical and radiographic study of one-stage dental implants. Clin. Oral Impl. Res. 2008; 19: 254–258.

Konijn GA, et al. Confocal microscopy for visualization of bone remodeling. Path Res Pract 192: 566-572, 1996.

Koo S, Konig Júnior B, Mizusaki CI, Allegrini Júnior S, Yoshimoto M, Carbonari MJ. Effects of alcohol consumption on osseointegration of titanium implants in rabbits. Implant Dent. 2004; 13: 232-237.

Kudo M , Matsui Y, Ohno K, Michi K. A histomorphometric study of the tissue reaction around hydroxyapatite implants irradiatedafter placement. J Oral Maxillofac Surg. 2001; 59:293-300.

Lan J, Wang Z, Wang W, Wang J, Cheng X. The effect of combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblastic growth factor or insuline-like growth factor-I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy. J Periodontol. 2006; 77(3): 357-363.

Lan J, Wang ZF, Shi B, Xia HB, Cheng XR. The influence of recombinant human BMP-2 on bone–implant osseointegration: biomechanical testing and histomorphometric analysis Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2007; 36: 345–349.

Liljensten E, Larsson C, Thomsen P, Blomgvist G, Hirsch JM, Wedenberg C. Studies of the healing of bone grafts, and the incorporation of titanium implants in grafted bone: an experimental animal model. J Mat Sci. 1998, 9:535-541.

Lindsey WH. Osseous tissue engeneering with gene therapy for facial bone reconstruction. Laryngoscope. 2001; 111(7):1128-1136.

Lourenço EJV. Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs): análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio em coelhos. [tese] Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2002.

Lourenço Junior ET. Estudo metodológico de avaliação do crescimento ósseo ao redor de implantes osseointegrados através de microscopia confocal de varredura a laser e torque de remoção. [tese] Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 1998.

Lu M, Rabie ABM. Microarchitecture of rabbit mandibular defects grafted with intramembranous or endochondral bone shown by micro-computed tomography. Br J Oral Maxillofac Surg. 2003; 41:385-391.

Masters DH. Bone and bone substitutes. CDA J. 1988;16(1):56-65.

Mohammadi S, Rasmusson L , Goè Ransson L, Sennerby L, Thomsen P, Kahnberg KE. Healing of titanium implants in onlay bone grafts: an experimental rabbit model. J Mat Sci. 2000; 11:83-89.

Munhoz EA, Ferreira Junior O, Yaedu RYF, Granjeiro JM. Radiographic assessment of impacted mandibular third molar sockets filled with composite xenogenic bone graft. Dentomaxillofacial Radiology. 2006; 35, 371–375.

Nikolidakis D, Meijer GI, Oortgiesen DAW, Walboomers XF, Jansen JA. The effect of a low dose of transforming growth factor b1 (TGF-b1) on the early bone-healing around oral implants inserted in trabecular bone. Biomaterials. 2009; 30: 94–99.

Nishikawa T, Masuno K, Mori M, Tajime Y, Kakudo K, Tanaka A. Calcification at the interface between titanium implants and bone:Observation with confocal laser scanning microscopy. J Oral Implan. 2006; XXXII: 211-217.

Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: Human histology and clinical outcome. Int J O Maxillofac Implant. 2002; 17(2): 249-257.

Ong CT, Ivanovski S, Needleman IG, Retzepi M, Moles DR, Tonetti MS, et al. Systematic review of implant outcomes in treated periodontitis subjects. J Clin Periodontol. 2008; 35(5):438-462.

Papalexiou V, Novaes Jr AB, Grisi MFM, Souza SSLS, Taba Jr M, Kajiwara JK. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites A confocal laser scanning microscopic study. Clin Oral Impl Res. 2004; 15:44–53.

Peterson LJ. Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea, 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan;1996.

Ponzoni, D. Avaliação da osseointegração promovida por implantes jateados por Al2O3 instalados imediatamente após exodontia. Analise histológica e histométrica em cães. [tese] Araçatuba, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual de São Paulo, 2004.

Rahmani M, Shimada E, Rokni S, Deporter DA, Adegbembo AO, Valiquette N, et al. Osteotome sinus elevation and simultaneous placement of porous-surfaced dental implants: a morphometric study in rabbits. Clin. Oral Impl. Res. 2005; 16: 692–699.

Sakakura CE, Margonar R, Holzauhen M, Nociti Jr FH, Alba Jr RC, Marcantonio Jr E. Influence of cyclosporin a therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. J Periodontol. 2003; 74(7): 976-981.

Sartori S, Silvestri M, Forni F, Cornaglia AI, Tesei , Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. Clin Oral Implan Res. 2003; 14:369-372.

Sawai T, Niimi A, Johanson CB, Sennerbi L, Ozeki K, Takahashi H, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on bone tisue reactions to c.p. titanuium implants placed in free autogenous bone grafts. Clin Oral Inplan Res. 1998; 9: 384-397.

Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Wieland M, Schmitz L, Engelhardt E, et al. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic1) or a collagen-coated natural bone mineral

(BioOss Collagen1): an immunohistochemical study in dogs. Int J Oral Maxillofac. Surg. 2007; 36: 1198–1206.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D, et al. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. Clin Oral Impl. Res. 2008; 19: 402–415.

Sennerby L, Thomsen P, Erikson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. Int J Oral Maxillofac Impl.1992; 7: 62-71.

Sicca CM, Corotti MV, Sgarbosa SH, Cestari TM, Cavalcanti MG, Ferreira PM, et al. Comparative histomorphometric and tomographic analysis of maxillary sinus floor augmentation in rabbits using autografts and xenografts. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008; 86:188-196.

Sunitha RV, Ramakrishnan T, Kumar SS, Emmadi P. Soft tissue preservation and crestal bone loss around single-tooth implants. J Oral Implantol. 2008; 34(4): 223-229.

Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. Bone. 1997;21:507–514.

Taga EM. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. BCI. 1996;3(1):59-70.

Taga R, Cestari TM, Silva TL, Stipp ACM. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. Rev Bras Implant. 1997; 1(1):13-20.

Taga R, Cestari TM, Taga EM, Assis GF, Marine MG. Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica da reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia tratado com mistura de Osseobond e Biohapatita e membrana absorvível de cortical óssea bovina. JBE. 2000;1(1):78-87.

Therheyden H, Jepsen S, Möller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. Clin Oral Implant Res. 1999; 10:510-521.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965; 150(3698):893-899.

Veis AV, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK, et al. Osseointegration of Osseotites and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. Clin Oral Impl Res. 2004; 15: 54–61.

Yoshimoto M, Konig B, Allegrini S, Lopes CC, Carbonari MJ, Liberti EA, et al., 2004 Bone healing after the inferior alveolar nerve lateralization: A histologic study in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). J Oral Maxillofac Surg. 2004; 62 (Suppl 2):131-135.

You TM, Choi BH, Li J, Jung JH, Lee HJ, Lee SH, et al. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103:e8-e12.

Zaffe D, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Brusotti C, Soncini M, Pietrabissa R, et al. Behavior of the bone–titanium interface after push-in testing: A morphological study. J Biomed Mater Res A. 2003;64(2):365-371.

Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP, Schupbach P, Berlundh T. Alveolar Ridge Augmentation with Bio-Oss: A Histological Study in Humans. Int J Period Res Dent. 2001; 21(3):289-295.